

INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.

**ProQuest Information and Learning
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA
800-521-0600**

UMI[®]

Université de Sherbrooke

**Analyse des composantes de la matrice extracellulaire dans la muqueuse de l'intestin
grêle des patients atteints par la maladie de Crohn**

Par

Yamina Bouatrouss

Département d'anatomie et de biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de

philosophiae doctor (Ph.D.)

Sherbrooke, février 2000



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-67094-5

Canada

*à mes parents, à mon mari Abdessadek,
à mon fils Yasser, à ma fille Sarah
et à toute ma famille*

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	ii
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
LISTE DES PUBLICATIONS.....	xii
RÉSUMÉ.....	xiii
 I. INTRODUCTION.....	 1
1. Maladie de Crohn.....	1
1.1 Processus général de l'inflammation intestinale.....	1
1.2. Étiologie.....	2
1.3. Caractéristiques pathologiques majeures	3
1.4. Caractéristiques histopathologiques	3
2. Implication de l'épithélium intestinal dans le processus inflammatoire	5
2.1. Anomalies cellulaires de l'épithélium intestinal dans la maladie de Crohn.....	5
2.1.1. Altérations ultrastructurales des composantes de la barrière intestinale	6
2.1.2. Anomalies fonctionnelles	7

3. Anomalies immunologiques dans la muqueuse de l'intestin	
des patients atteints par la maladie de Crohn	8
3.1. Altération de la réponse humorale	9
3.2. Activation de la réponse cellulaire	10
3.2.1. Production des cytokines par les cellules immunes	11
3.2.2. Production et importance des cytokines	
pro-inflammatoires dans la maladie de Crohn	12
4. Matrice extracellulaire	13
4.1. Membrane basilaire	14
4.1.1. Collagène de type IV	14
4.1.2. Laminines	15
4.2. Molécules associées	16
4.2.1. Ténascine-C	17
4.2.2. Fibronectine cellulaire	19
4.2.3. Protéoglycans	20
5. Objectifs du projet de recherche	21
 II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	 23
1. Spécimens	23
2. Préparation des tissus	25

2.1. Congélation des tissus.....	25
2.2. Préparation des blocs de paraffine.....	25
3. Confection des coupes	26
3.1. Coupes à congélation.....	26
3.2. Coupes de paraffine	26
4. Détection des antigènes par immunofluorescence indirecte	26
4.1. Traitement enzymatique des coupes de paraffine	26
4.2. Procédure d'immunofluorescence indirecte	27
5. Anticorps utilisés	28
5.1. Anticorps primaires.....	28
5.2. Anticorps secondaires	28
6. Analyse par RT-PCR	30
6.1. Extraction d'ARNs totaux des tissus.....	30
6.2. Transcription inverse	32
6.3. Réaction de polymérisation en chaîne.....	33
7. Analyses statistiques	35
 III. RÉSULTATS.....	 36
1. Observations préliminaires	36
2. Analyse des laminines dans la muqueuse de l'intestin grêle des	

patients atteints par la maladie de Crohn.....	37
2.1. Expression et distribution des chaînes α des laminines	
le long de l'axe crypte-villosité.....	37
2.2. Comparaison quantitative de l'expression des	
chaînes α des laminines dans la région des cryptes intestinales.....	41
2.3. Expression des transcrits des chaînes α des laminines.....	44
3. Analyse de la ténascine-C dans la muqueuse de l'intestin grêle des patients	
atteints par la maladie de Crohn	44
3.1. Expression et distribution de la ténascine-C dans l'axe	
crypte-villosité.....	44
3.2. Analyse quantitative de l'expression de la ténascine-C	
dans la région des cryptes intestinales	47
3.3. Expression des transcrits de la ténascine-C.....	48
4. Mise en évidence de l'altération des myofibroblastes dans la muqueuse	
de l'intestin grêle des patients atteints par la maladie de Crohn	51
4.1. Analyse quantitative de l'expression de l'α-actine du muscle	
lisse dans la région myofibroblastique péricryptale	51
4.2. Co-distribution de la ténascine-C et de l'α-actine dans	
la muqueuse de l'intestin grêle	52
4.3. Relation entre l'expression de la ténascine-C et l'α-actine	
du muscle lisse.....	55

4.4. Comparaison entre l'expression de la ténascine-C, de la décorine et de la fibronectine dans la région péricryptale.....	56
4.5. Confirmation de l'altération des myofibroblastes péricryptaux	59
 IV. DISCUSSION	62
1. Implication de la matrice extracellulaire dans le processus inflammatoire chez les patients atteints par la maladie de Crohn.....	62
1.1. Altération de l'expression des chaînes α des laminines	62
1.2. Altération de l'expression de la ténascine-C	64
2. Altération de la couche myofibroblastique péricryptale dans le processus inflammatoire chez les patients atteints par la maladie de Crohn.....	67
3. Relations possibles entre les anormalités des composantes de la matrice extracellulaire et des myofibroblastes dans le processus inflammatoire	71
 V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	77
 REMERCIEMENTS.....	82
 BIBLIOGRAPHIE.....	85

LISTE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1.	Organisation de la muqueuse de l'intestin grêle	4
FIGURE 2.	Comparaison de la localisation de l'expression de la chaîne α1 de la laminine-1 dans la région des cryptes des spécimens d'intestin grêle de contrôle et de maladie de Crohn non inflammés.	39
FIGURE 3.	Expression et distribution des laminines dans la muqueuse de l'intestin grêle des patients atteints par la maladie de Crohn.....	40
FIGURE 4.	Analyse quantitative de l'expression des chaînes α1, α2 et α3 des laminines dans la région des cryptes intestinales.	42
FIGURE 5.	Expression de la chaîne α1 de la laminine-1 à la demie inférieure des cryptes intestinales.	43
FIGURE 6.	Analyse de l'expression des transcrits des chaînes α des laminines dans l'intestin grêle des patients atteints par la maladie de Crohn	45

FIGURE 7. Expression et distribution de la ténascine-C dans la muqueuse de l'intestin grêle de contrôle et de patients atteints par la maladie de Crohn.	46
FIGURE 8. Expression de la ténascine-C dans la région péricryptale intestinale.	49
FIGURE 9. Analyse de l'expression des transcrits de la ténascine-C dans la muqueuse de l'intestin grêle des patients atteints par la maladie de Crohn	50
FIGURE 10. Expression de l' α -actine du muscle lisse au niveau de la couche myofibroblastique péricryptale.	53
FIGURE 11. Immunodétection de la ténascine-C et de l' α -actine du muscle lisse dans la muqueuse de l'intestin grêle des patients atteints par la maladie de Crohn.	54
FIGURE 12. Relation entre l'expression de la ténascine-C et de l' α -actine du muscle lisse dans la couche myofibroblastique péricryptale intestinale.	57

FIGURE 13. Comparaison de l'expression de la ténascine-C, de la décorine et de la fibronectine dans la région des cryptes intestinales.....	58
--	----

FIGURE 14. Immunolocalisation de l' α -actine du muscle lisse et de la desmine dans la muqueuse de l'intestin grêle des patients atteints par la maladie de Crohn.	60
---	----

TABLEAUX

1. Données cliniques sur les spécimens d'intestin grêle utilisés.	24
2. Liste des anticorps primaires utilisés pour l'immunofluorescence indirecte.	29

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α-AML:	α-actine du muscle lisse
ADNc :	ADN complémentaire
Dc:	décorine
EGF :	epidermal growth factor
Fn:	fibronectine
IFNγ :	interféron γ
Ig:	immunoglobuline
IL :	interleukine
IL-2R	récepteur de l'interleukine-2
MC :	maladie de Crohn
MC-I:	maladie de Crohn-inflammée
MC-NI :	maladie de Crohn-non inflammée
MEC:	matrice extracellulaire
pb:	paires de bases
PBS :	tampon phosphate salin
PCR:	réaction de polymérisation en chaîne
RT:	transcriptase inverse
TGFβ:	transforming growth factor β

Tn-C:	ténascine-C
Tn-X:	ténascine-X
TNFα:	tumor necrosis factor

LISTE DES PUBLICATIONS

Simoneau A., Herring-Gillam F.E., Vachon P.H., Perreault N., Basora N., Bouatrouss Y., Pageot L.-P., Zhou J., Beaulieu J.-F. (1998). Identification, distribution, and tissular origin of the $\alpha 5(IV)$ and $\alpha 6(IV)$ collagen chains in the developing human intestine. *Dev. Dyn.* 212 :437-447.

Basora N., Desloges N., Qing Chang., Bouatrouss Y., Gosselin J., Poisson J., Sheppard D., Beaulieu J.-F. (1998). Expression of the $\alpha 9\beta 1$ integrin in human colonic epithelial cells : Resurgence of the foetal phenotype in a subset of colon cancers and adenocarcinoma cell lines. *Int. J. Cancer.* 75 :738-743.

Desloges N., Basora N., Perreault N., Bouatrouss Y., Sheppard D., Beaulieu J.-F. (1998). Regulated expression of integrin $\alpha 9\beta 1$ in the epithelium of developing human gut and in intestinal cell lines : Relation with cell proliferation. *J. Cell. Biochem.* 71 :536-545.

Bouatrouss Y., Poisson J., Beaulieu J.-F. (1998). Studying the basement membrane. *Methods in disease : Investigating the gastrointestinal tract.* Edited by Preedy V.R, watson R.R. London, Greenwich Medical Media, pp.191-200.

Basora N., Herring-Gillam F.E., Boudreau F., Perreault N., Pageot L.-F., Simoneau M., Bouatrouss Y., Beaulieu J.-F. (1999). Expression of functionally distinct integrin $\beta 4$ subunit variant in relation to the differentiated state in human intestinal cells. *J. Biol. Chem.* 274 (42) :29819-29825.

Lussier C., Bouatrouss Y., Basora N., Beaulieu J.-F. (1999). Cell-matrix interactions in human small intestinal mucosa. *Microsc. Res. Techn.* (en révision).

Bouatrouss Y., Herring-Gillam F.E., Gosselin J., Poisson J., Beaulieu J.-F. (2000). Altered expression of laminins in the small intestinal mucosa with Crohn's disease. *Am. J. Pathol.* 56 (1) : 45-50.

**ANALYSE DES COMPOSANTES DE LA MATRICE
EXTRACELLULAIRE DANS LA MUQUEUSE DE L'INTESTIN GRÊLE
DES PATIENTS ATTEINTS PAR LA MALADIE DE CROHN**

Par

Yamina Bouatrouss

Thèse présentée à la faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.) en biologie cellulaire, Université de Sherbrooke

L'expression et la distribution des principaux constituants de la matrice extracellulaire sont bien étudiées au niveau de la muqueuse de l'intestin grêle normal. Plusieurs évidences ont démontré leur implication dans différents phénomènes cellulaires tels que la prolifération, la migration et la différenciation. Cependant, la composition de la matrice extracellulaire dans les maladies inflammatoires, en particulier, dans la maladie de Crohn n'est pas encore établie. Dans cette étude, nous avons procédé à une caractérisation de la matrice extracellulaire de la muqueuse des patients atteints par la maladie de Crohn en comparaison avec celle des contrôles. Nous avons analysé, parmi les composantes majeures de la lame basale les laminines, et de la matrice interstitielle la ténascine-C et la décorine. Dans l'intestin grêle normal, trois laminines distinctes ont été identifiées. La laminine-1 ($\alpha1\beta1\gamma1$) et la laminine-5 ($\alpha3\beta2\gamma3$) sont restreintes à la base des cellules épithéliales de la villosité alors que laminine-2 ($\alpha2\beta1\gamma1$) est confinée au niveau des cryptes. Dans la maladie de Crohn, nous avons observé une réorganisation de ces molécules au niveau des cryptes, qui se manifeste par une disparition de la laminine-2 et son remplacement par la laminine-1 et la laminine-5. Une altération des molécules de la matrice interstitielle a également été observée. Elle se traduit par une réduction significative de l'expression de la ténascine-C et de la décorine au niveau de la couche myofibroblastique péricryptale. L'absence de la laminine-2 et la réduction de l'expression de la décorine et de ténascine-C, semblent être liées à une altération des myofibroblastes péricryptaux telle que mise en évidence par la disparition de l' α -AML. Ces observations ont été confirmées par le fait que seules les molécules d'origine principalement myofibroblastiques comme la ténascine-C, la décorine et la laminine-2 ont été affectées par l'altération des myofibroblastes. Nous avons également identifié des cellules péricryptales anormales qui expriment l' α -AML et occasionnellement la desmine. L'apparence de ces cellules est différente de celle des myofibroblastes péricryptaux. Ces cellules pourraient représenter un type intermédiaire entre les myofibroblastes et les cellules musculaires. Ces changements importants de composition de la matrice extracellulaire ainsi que de l'altération des myofibroblastes se produisant dans la maladie de Crohn suggèrent que ces deux éléments pourraient jouer un rôle important dans la cascade de l'inflammation chronique de l'intestin.

I. INTRODUCTION

1. MALADIE DE CROHN

La maladie de Crohn (MC) est l'une des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Elle a été identifiée pour la première fois par Crohn et al (1932). C'est une maladie invalidante, qui fait partie des affections de longue durée. Elle touche particulièrement les jeunes adultes, et il n'existe pas de traitement spécifique. Des données récentes sur la distribution géographique de la MC suggèrent un gradient d'incidence de risque nord-sud, qui est particulièrement élevé dans les populations de l'Europe et de l'Amérique du nord (Rogers et al.; 1998). La MC peut atteindre n'importe quel segment du tube digestif mais elle affecte principalement la région iléo-cœcale (50%), le reste de l'intestin grêle (15%), le côlon (25%) et la région ano-rectale (15%) (Chadwick, 1991 ; Stenson, 1995).

1.1. PROCESSUS GÉNÉRAL DE L'INFLAMMATION INTESTINALE

L'inflammation est une réponse commune de l'organisme pour se défendre à la suite d'une blessure, d'un choc ou encore d'une infection bactérienne ou virale. L'intestin est un organe susceptible à l'inflammation puisque sa surface, constituée par un épithélium simple, est toujours en contact permanent avec les éléments de la diète, des agents pathogènes, mitogènes, etc. À cause de ce contact omniprésent avec ces agents, la muqueuse intestinale est, en permanence, en état d'inflammation ``physiologique``,

représentée par l'abondance des lymphocytes T, B, plasmocytes, macrophages, et autres. Ces cellules s'infiltrant dans la lamina propria et l'épithélium où elles jouent un rôle régulateur, en éliminant l'agent causal de l'inflammation. Quand le nombre de ces cellules devient excessif, l'inflammation ``pathologique`` prend place avec des conséquences qui varient en fonction de la cause et du mécanisme impliqué (Fiocchi et al., 1994; Fiocchi, 1997a).

Dans la maladie de Crohn, l'inflammation est chronique. L'infiltrat cellulaire contient un mélange de plasmocytes, de macrophages, et de lymphocytes. Ces cellules produisent des médiateurs de l'inflammation, qui endommagent directement le tissu avoisinant et favorisent le recrutement de cellules inflammatoires, telles que les neutrophiles, par chimiotactisme.

1.2. ÉTIOLOGIE

La cause et les mécanismes impliqués dans cette maladie sont encore inconnus. Même si une prédisposition génétique est suggérée par le taux de concordance élevé observé chez les jumeaux monozygotes (Podolsky et al., 1991), aucun marqueur génétique n'a encore été identifié (Colombel et Hugot, 1996; Brant et al., 1998). Les mécanismes qui sont proposés dans la pathogenèse de la MC (Sartor, 1995; Fiocchi, 1998), incluent un ou plusieurs des composantes suivantes : (1) un défaut de la barrière épithéliale de la muqueuse intestinale, (2) un défaut de l'immunorégulation résultant d'un excès des réponses agressives ou d'une réponse auto-immune, (3) un déséquilibre entre les cytokines

pro-inflammatoires, anti-inflammatoires et les cellules immunes régulatrices, (4) un défaut de la réponse immunosuppressive à des molécules régulatrices, et (5) la présentation d'un antigène anormal.

1.3. CARACTÉRISTIQUES PATHOLOGIQUES MAJEURES

L'intestin affecté par la MC présente deux caractéristiques pathologiques importantes qui permettent de le distinguer de l'autre maladie inflammatoire majeure de l'intestin, la colite ulcéreuse (Rubin et Farber, 1990). En effet, dans la MC, l'inflammation est transmurale puisqu'elle implique toutes les couches de la paroi intestinale. L'inflammation commence généralement dans la muqueuse, se propage dans la sous muqueuse et peut même atteindre la séreuse. La seconde caractéristique typique à la MC est son atteinte segmentaire, puisque l'inflammation de l'intestin est discontinue. En effet, les segments de tissu inflammé peuvent être séparés par du tissu d'apparence saine.

1.4. CARACTÉRISTIQUES HISTOPATHOLOGIQUES

La muqueuse de l'intestin grêle normal est formée de villosités, qui s'étendent dans la lumière intestinale et des cryptes (Figure 1). L'épithélium qui recouvre les villosités et les cryptes repose sur une lame basale et est constitué de plusieurs types cellulaires. La lamina propria se répartit dans l'axe de la villosité et entre les cryptes. La limite interne de la

muqueuse de l'intestin grêle est représentée par la muscularis mucosa, une couche musculaire bien organisée qui repose sur la sous-muqueuse.



Figure.1. Organisation de la muqueuse de l'intestin grêle adulte. c: crypte; lp: lamina propria; mm: muscularis mucosa; v: villosité. (Adapté de Beaulieu, 1997a)

La muqueuse de l'intestin grêle affectée par la MC présente les caractéristiques histologiques de l'inflammation chronique, qui comprennent deux composantes majeures liées à la réaction inflammatoire (Lee et al., 1997): l'infiltration abondante des plasmocytes et des lymphocytes dans la lamina propria et la présence des granulomes qui sont formés par des cellules multinuclées et des histiocytes. La présence de l'inflammation dans la lamina propria entraîne des changements prononcés dans l'architecture des villosités et des cryptes. Les villosités sont atrophiques ou pseudo-atrophiques. La présence des ulcérations entre les villosités est due à l'abondance des plasmocytes dans la lamina propria. Les cryptes sont hyperplasiques. La muscularis mucosa est hypertrophique et désorganisée. Dans les régions les plus ulcérées, une accumulation de lymphocytes et/ou une hyperplasie et une ulcération des follicules lymphoïdes peuvent être observées.

2. IMPLICATION DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL DANS LE PROCESSUS INFLAMMATOIRE

2.1. ANOMALIES CELLULAIRES DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL DANS LA MALADIE DE CROHN

L'épithélium intestinal constitue une interface majeure avec l'extérieur de l'organisme. Une de ses premières fonctions est d'agir comme barrière physique entre le contenu de la lumière intestinale, imprévisible et potentiellement pathogène, et le milieu intérieur représenté par la lamina propria qui communique avec la circulation sanguine. Il est donc évident que les composantes de la barrière épithéliale comprenant les différents types cellulaires (cellules absorbantes, cellules à mucus, cellules de Paneth), jouent un rôle important dans ce processus de protection.

De nombreux travaux ont démontré des signes d'altération ultrastructurale de ces composantes de la barrière épithéliale intestinale dans les lésions causées par la MC (voir section 2.1.1) (Dvorak et Dikersin, 1979, 1980; Schattenfroh et al., 1994). L'agent responsable de ces changements demeure toujours inconnu. Il est encore difficile de déterminer si la lésion de l'épithélium est produite au début du processus pathologique par un agent inconnu ou s'il s'agit d'anomalies épithéliales secondaires survenues suite à la réaction inflammatoire dans la lamina propria.

2.1.1. ALTÉRATIONS ULTRASTRUCTURALES DES COMPOSANTES CELLULAIRES DE LA BARRIÈRE ÉPITHÉLIALE INTESTINALE

Dans la MC, des altérations morphologiques surviennent au niveau des principaux types cellulaires qui constituent l'épithélium intestinal (cellules absorbantes, cellules de Paneth, cellules à mucus). (Dvorak et Dickersin, 1979, 1980; Otto et al., 1981; Schattenfroh et al., 1994). Les cellules absorbantes ne sont pas augmentées en nombre mais montrent des foyers de nécrose, un raccourcissement des microvillosités et une augmentation du nombre de lysosomes. Les vésicules denses et les vacuoles sont abondantes. Le glycocalyx peut être absent, réduit ou augmenté dans les régions atteintes par la maladie de Crohn. Dans les régions ulcérées les plus atteintes où l'infiltration des cellules inflammatoires est abondante, la lame basale sous-épithéliale et le feuillet péricryptal peuvent être détruits (Otto et al., 1981). Les cellules de Paneth sont augmentées en nombre et montrent un rejet des granules de sécrétion dans la lumière de la glande. La plupart des cellules possèdent de nombreuses inclusions lysosomales larges et irrégulières. Les cellules à mucus produisent le mucus dans la lumière intestinale qui forme un revêtement de protection aux agents pathogènes présents dans la lumière intestinale. Le nombre de cellules à mucus ainsi que la production en mucus sont augmentés dans les régions atteintes par la MC.

La perte d'intégrité de la couche épithéliale a été observée dans les régions atteintes par la MC. Elle se manifeste par un élargissement des espaces intercellulaires dans les régions œdémateuses (Schattenfroh et al., 1994) et ainsi que par une altération structurale

des jonctions serrées (Zonula occludens) (Marin et al., 1983). Ces dernières présentent une fragmentation importante des sillons ou même une absence totale dans les régions où l'activité de la maladie est forte (Marin et al., 1983; Balda et al., 1992).

2.1.2. ANOMALIES FONCTIONNELLES

Les altérations morphologiques observées dans le cas de la MC peuvent se traduire par des anomalies fonctionnelles immunologiques (humorales et cellulaires) ou non immunologiques dans la muqueuse intestinale. Par exemple, l'altération structurale des jonctions serrées au niveau des cellules épithéliales peut se manifester par une anomalie fonctionnelle de la perméabilité paracellulaire (Hollander, 1988 ; Madara, 1989), qui entraîne un passage important des molécules au niveau de l'espace intercellulaire dans l'intestin des patients atteints par la maladie de Crohn (Howden et al., 1991; Bjarnason, 1994). Ces données supportent l'hypothèse que l'augmentation de la perméabilité cellulaire dans la MC serait secondaire à l'anormalité de la jonction serrée (Hollander, 1988). Cependant, des travaux antérieurs ont suggéré que l'anormalité de la perméabilité devrait plutôt être considérée comme un des facteurs étiologiques de la maladie, puisque cette augmentation de la perméabilité a été observée aussi chez les individus de parenté de premier degré avec les patients atteints par la MC (Hollander et al., 1986), suggérant un défaut héréditaire possible de désordre de la barrière épithéliale intestinale. Ces données ont été contestées plus tard par des travaux qui n'ont démontré aucun changement de perméabilité chez les individus ayant un lien de parenté avec ceux atteints par la MC

(Munkholm et al., 1994 ; Howden et al., 1994). Ces résultats controversés sont probablement dus à la diversité des méthodes utilisées ainsi qu'aux facteurs pouvant influencer la perméabilité cellulaire, mais qui n'apparaissent pas cliniquement comme l'alcool, les infections intestinales et autres (pour revue, voir Bjarnason et al., 1995). L'altération du processus immunologique peut également être liée au défaut de la barrière épithéliale intestinale, ce qui permettrait l'entrée non contrôlée d'agents ou d'antigènes de la lumière intestinale. Ceci pourrait mener par la suite à une activation locale du système immunitaire dans la lamina propria (Otto et al., 1981).

3. ANOMALIES IMMUNOLOGIQUES DANS LA MUQUEUSE DE L'INTESTIN DES PATIENTS ATTEINTS PAR LA MALADIE DE CROHN

L'association de la susceptibilité génétique, de la stimulation antigénique locale, et d'éventuels autres facteurs environnementaux aboutirait au déclenchement, dans la muqueuse intestinale, d'une réponse immunitaire qui n'est plus régulée de façon appropriée. Cette réponse immunologique anormale semble résulter d'une hyperactivation du système immunitaire de l'intestin qui se traduit quantitativement par une augmentation dans la lamina propria du nombre de lymphocytes B et T, des macrophages, des neutrophiles, et des plasmocytes (Brandtzaeg et al., 1989; MacDermott et al., 1993; Jacquot et al., 1994 ; McCabe et al., 1996). Cet infiltrat de cellules inflammatoires présente aussi des altérations ultrastructurales qui sont liées au processus de l'inflammation (Schattenfroh et al., 1994).

L'infiltrat cellulaire dans la MC est composé par des cellules B et T avec une prédominance des cellules B. Ces dernières sont adjacentes aux régions qui présentent des ulcérations et les cellules T se retrouvent autour des granulomes (Schreiber et al., 1992). Cette augmentation du nombre de cellules lymphoïdes s'accompagne par des modifications phénotypiques et fonctionnelles.

3.1. ALTÉRATION DE LA RÉPONSE HUMORALE

Dans l'intestin grêle normal, la lumière intestinale contient de nombreux antigènes. Certains d'entre eux peuvent stimuler physiologiquement le système immunitaire de la muqueuse. Cette réponse humorale est nettement prédominée par les plasmocytes à IgA qui représentent 80% de la population des plasmocytes. Les plasmocytes à IgM ne représentent que 16% et les plasmocytes à IgG 5% de la population (Jacquot et al., 1994). Les IgA sont produits par les plasmocytes provenant de plusieurs précurseurs issus des plaques de Peyer et des follicules lymphoïdes où leur différenciation est orientée vers la production d'IgA. Ces précurseurs migrent par un circuit hémolymphatique après relais dans les ganglions mésentériques des follicules vers la muqueuse intestinale.

Dans la maladie de Crohn, la réponse humorale est amplifiée et médiée par les cytokines pro-inflammatoires et immunorégulatrices (énumérées à la section 3.2.2). Le nombre des plasmocytes à IgG est multiplié par 30, celui des plasmocytes à IgM par 5, et celui des plasmocytes à IgA par 2 dans la muqueuse intestinale pathologique (Brandtzaeg et al., 1989). Cette augmentation de la production locale d'IgG dans la lamina propria

n'est probablement pas sans conséquences sur la muqueuse. À la différence des IgA, les IgG peuvent intervenir dans le processus de cytotoxicité dépendante des anticorps et former des complexes immuns activant le complément par voie classique (Brandtzaeg et al., 1989; Schreiber et al., 1992). Une activation locale du complément a été démontrée dans les lésions des maladies inflammatoires de l'intestin (Halstensen et Brandtzaeg, 1991). L'activation de la cascade de la voie du complément permettrait la libération de molécules chimiotactiques activatrices pour les macrophages et les polynucléaires. Celles-ci produiront, à leur tour, des médiateurs de l'inflammation comme les prostaglandines, les facteurs d'activation des plaquettes (PAF), les thromboxanes, des radicaux libres, et des leucotriènes. Ce sont les médiateurs de la réponse inflammatoire qui sont responsables de la majorité des signes pathologiques cliniques des maladies inflammatoires intestinales tels que la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, et l'œdème de la muqueuse intestinale (Brandtzaeg et al., 1989; MacDermott et al., 1993).

3.2. ACTIVATION DE LA RÉPONSE CELLULAIRE

Les cytokines sont parmi les facteurs solubles qui interviennent à différents niveaux dans la réponse immune, notamment dans la réponse immunitaire cellulaire et dans l'interaction des cellules du système immunitaire avec d'autres types de cellules (Jacquot et al., 1994).

3.2.1. PRODUCTION DES CYTOKINES PAR LES CELLULES IMMUNES

L'épithélium intestinal normal est en contact permanent avec les antigènes de la lumière intestinale. Ces derniers entrent en contact avec les cellules immunitaires grâce à l'intervention des cellules épithéliales et des cellules M (Membrane-like epithelial cell).

Dans la maladie de Crohn, un antigène de nature inconnue peut entrer à travers les cellules M de l'épithélium qui possèdent un noyau basal et un cytoplasme superficiel extrêmement fin au travers duquel des vésicules vont transporter des antigènes captés de la lumière vers les cellules immunitaires (macrophages et lymphocytes) qui recouvrent les follicules lymphoïdes. Les cellules M assurent le transport de l'antigène de la lumière vers le site d'initiation de la réponse immunitaire. Cet antigène peut également pénétrer à travers l'espace intercellulaire, par voie paracellulaire ou par endocytose à travers les entérocytes. Ces derniers peuvent présenter l'antigène au macrophage par l'intermédiaire de l'antigène de classe II (MacDermott et al., 1993; Bousvaros et al., 1995). La présence de l'antigène dans la lamina propria entraîne la stimulation des macrophages qui vont produire des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 β , TNF α , IL-6, et IL-8. Ces cytokines sont responsables des phénomènes inflammatoires. IL-1 β et TNF α peuvent intervenir dans l'initiation de la réponse immunitaire et dans les mécanismes de l'inflammation. IL-8 aurait un effet chimiotactique sur les neutrophiles (Jacquot et al., 1994).

Par la suite, la présence de IL-1 dans la lamina propria et la présentation de l'antigène par les macrophages aux cellules T entraînent leur activation, conduisant à la production d'INF γ et IL-2 (Jacquot et al., 1994). Ces deux cytokines interviennent dans la régulation de la

réponse immunitaire. Il semble que l'INF γ augmente l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de la classe II (CMH II) dans les cellules épithéliales intestinales (Mayer et al., 1991). Ceci entraînerait l'augmentation du nombre d'antigènes présentés par les cellules épithéliales. Par ailleurs, la production d'IL-2 résultant de l'activation des lymphocytes T pourrait médier la voie de production prédominante des IgG par les lymphocytes B (Schreiber et al., 1992; MacDermott et al., 1993).

3.2.2. PRODUCTION ET IMPORTANCE DES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES DANS LA MALADIE DE CROHN

Les cytokines sont d'importance fondamentale dans l'inflammation intestinale (Pour revue, voir Brynskov et al., 1992; Hoang et al., 1993; Fiocchi, 1998). Certaines d'entre elles sont immunorégulatrices (IL-2, IL-2R, IL-4, IL-10, IL-13) alors que d'autres sont pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF α , INF γ). Dans l'intestin adulte normal, ces cytokines sont produites principalement par les cellules immunes et l'équilibre est maintenu entre la production des cytokines pro-inflammatoires et des cytokines anti-inflammatoires (Wallace et Beck, 1996 ; Fiocchi, 1998). Dans le cas de l'inflammation chronique de l'intestin, la source, la concentration et la fonction de ces molécules semblent être altérées (pour revue, voir Fiocchi, 1997b). Les cytokines peuvent être produites au cours du processus inflammatoire également par les cellules non immunes, comprenant les cellules épithéliales, endothéliales, nerveuses, musculaires et mésenchymateuses (pour revue, voir Fiocchi, 1997a, 1997b).

Les cytokines pro-inflammatoires ont fait l'objet de nombreux travaux puisqu'elles jouent un rôle important à différents stades de la réponse inflammatoire et servent comme médiateur de la lésion de la muqueuse. Reimund et al (1996) ont examiné la libération spontanée de IL-1, IL-6, TNF α dans des biopsies d'intestins de patients atteints par la MC. Ils ont démontré que ces cytokines sont augmentées tant dans les régions où la muqueuse est histologiquement normale que dans celle affectée par l'inflammation. Ces résultats supportent l'idée qu'une muqueuse d'apparence histologique normale pourrait être immunologiquement active. Ces résultats confirment les travaux de Sher et al (1995).

Des travaux ont démontré l'importance majeure de IL-1, TNF α , INF γ dans le processus inflammatoire de l'intestin chez différents modèles animaux (Sartor, 1994; Kojouharoff et al., 1997). Leurs résultats suggèrent que le traitement avec ces trois cytokines pourrait produire plusieurs caractéristiques universelles de l'inflammation intestinale comprenant l'activation des cellules immunes, mésenchymateuses et épithéliales, le chimiotactisme des cellules inflammatoires circulantes, et l'endommagement du tissu comprenant l'atrophie et l'ulcération des villosités ainsi que l'hyperplasie des cryptes.

4. MATRICE EXTRACELLULAIRE

L'épithélium intestinal repose sur une matrice extracellulaire spécialisée appelée membrane basilaire. Elle contient des composantes majeures spécifiques à la plupart des lames basales ainsi que les macromolécules non exclusives retrouvées également dans la matrice interstitielle.

4.1. MEMBRANE BASILAIRE

La membrane basilaire délimite le compartiment épithélial du compartiment mésenchymateux et comprend la lame basale ainsi que la lamina fibroreticularis. La lame basale est constituée principalement de collagène de type IV et de laminine ainsi que de plusieurs autres molécules telles que les protéoglycans comme le perlécan et le syndécan (Timpl, 1989; Leblond et Inoue, 1989; Paulsson, 1992; Yurchenco et O'Rear, 1994; Timpl, 1996). La membrane basilaire est impliquée dans la régulation d'un certain nombre de fonctions cellulaires telles que l'adhésion, la migration, et la différenciation (Timpl, 1989; Timpl et Brown, 1996).

4.1.1. COLLAGÈNE DE TYPE IV

Le collagène de type (IV) est l'une des composantes majeures de la lame basale. À l'aide de sa structure supramoléculaire, il forme un treillis complexe qui est associé avec d'autres molécules de la membrane basilaire. Plusieurs chaînes de collagène IV ont été identifiées dans l'intestin humain, incluant le collagène $\alpha 5(\text{IV})$ (pour revue, voir Beaulieu, 1997a). L'expression des chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 6$ est ubiquitaire le long de l'axe crypte-villosité. Dans nos travaux, nous avons porté un intérêt particulier à la chaîne $\alpha 5$ du collagène de type IV puisque c'est la seule chaîne dont l'expression est régulée dans l'intestin grêle humain. En effet, il a été démontré que la chaîne $\alpha 5$ du collagène IV est

exprimée dans l'intestin grêle fœtal au niveau baso-latéral des cellules épithéliales mais son expression est réprimée chez l'adulte (Beaulieu et al., 1994a; Simoneau et al., 1998; Bouatrouss et al., 1998). Des travaux récents dans notre laboratoire suggèrent une surexpression de cette molécule dans les cancers colorectaux (Qing et al., non publié). Ceci souligne son implication potentielle dans les processus de remodelage au cours du développement et dans les tumeurs du côlon. Des travaux ont démontré que l'anomalie au niveau de la chaîne $\alpha 5$ du collagène IV peut engendrer une pathologie rénale, le syndrome d'Alport (Barker et al., 1990). L'origine du collagène $\alpha 5(\text{IV})$ est double. Il est produit par les cellules épithéliales et par les cellules mésenchymateuses (Perreault et al., 1998; Simoneau et al., 1998).

4.1.2. LAMININES

Les laminines sont des molécules hétérotrimériques composées de 3 chaînes (α , β et γ). Ce sont des composantes majeures de la lame basale (Timpl, 1989; Timpl et Brown, 1996). Jusqu'à présent, 11 laminines ont été identifiées (Burgerson et al., 1994; Aumailley et Smyth, 1998). Trois laminines bien distinctes parmi les 11, ont été identifiées dans la muqueuse de l'intestin grêle normal: la laminine-1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$), la laminine-2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$) et la laminine-5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$). Les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ des laminines sont exprimées de manière différentielle le long de l'axe crypte-villosité dans l'intestin grêle humain (Beaulieu et Vachon, 1994b). La chaîne $\alpha 1$ est exprimée de l'apex de la villosité jusqu'à la jonction crypte-villosité et se trouve à la limite de détection dans les cryptes. La chaîne $\alpha 2$ est

confinée au niveau des cryptes selon un gradient croissant de la région supérieure jusqu'au fond de la crypte. Les chaînes $\beta 1$ et $\gamma 1$ sont distribuées uniformément le long de l'axe crypte-villosité. Beaulieu et Vachon (1994b) ont suggéré que la laminine-1 représente la forme villositaire alors que la laminine-2 représente la forme cryptale. Ce patron spatial d'expression de la laminine-1 et de la laminine-2 dans l'intestin humain supporte l'hypothèse d'une relation possible entre l'expression de ces molécules et les fonctions de la différenciation cellulaire (Beaulieu et Vachon, 1994b). En effet, des évidences ont montré qu'*in vitro*, la laminine-1, mais non la laminine-2, était impliquée dans la différenciation cellulaire (Vachon et Beaulieu, 1995b). Ce rôle de la laminine-1 a été confirmé par transfection des cellules Caco-2 avec un fragment d'ADNc anti-sens de la chaîne $\alpha 1$ de la laminine-1 (De Arcangelis et al., 1996). La chaîne $\alpha 3$, comme la chaîne $\alpha 1$, est restreinte à la villosité (Beaulieu et Vachon, 1994b; Leivo et al., 1996). Le rôle fonctionnel exact des différentes chaînes α des laminines au niveau des cellules de la crypte intestinale reste à déterminer.

4.2. MOLÉCULES ASSOCIÉES

Il a été démontré qu'au niveau de l'intestin grêle, en plus des constituants spécifiques aux lames basales, d'autres constituants sont retrouvés dans la matrice interstitielle et peuvent être associés à la membrane basilaire (pour revue, voir Beaulieu, 1997a).

4.2.1. TÉNASCINE-C

Chez l'humain, la ténascine-C est une glycoprotéine de la MEC de structure hexamérique. Elle est constituée de 6 sous-unités. Deux trimères se forment puis s'associent via le globule central par la formation de liens disulfures, donnant naissance à un hexamère (Chiquet-Ehrismann et al., 1994; Mackie, 1997). La caractéristique particulière de la ténascine-C est sa distribution dans le tissu normal et anormal. C'est une molécule exprimée au cours du développement dans divers organes au niveau de l'interface épithélium-mésenchyme. Elle est réduite à absente dans la plupart des tissus adultes (pour revue, voir Erickson et Bourdron, 1989; Crossin, 1996), alors qu'elle réapparaît dans le tissu conjonctif de divers types de tumeurs (Erickson et Bourdron, 1989; Chiquet-Ehrismann, 1993), dans certaines pathologies inflammatoires comme par exemple la cicatrisation des blessures (Mackie et al., 1988) et l'arthrite rhumatoïde (Mc Cachren et al., 1992). Ces auteurs suggèrent que la Tn-C joue un rôle important dans le remodelage des tissus.

Une autre caractéristique particulière à la Tn-C, est sa double propriété adhésive (Lotz et al., 1989) et anti-adhésive (Chiquet-Ehrismann, 1991; Sage et Bornstein, 1991). C'est la propriété anti-adhésive qui semble prédominante. Par exemple, il apparaît que les cellules qui adhèrent à la Tn-C ne subissent pas le réarrangement du cytosquelette observé dans le cas de la fibronectine (pour revue, voir Mackie, 1997). Cette double activité attribuée à la Tn-C est liée à la présence dans sa structure des sites distincts. Les domaines homologues à l'EGF et les domaines 7 et 8 homologues à la fibronectine de type III sont

responsables de l'activité anti-adhésive, alors que les sites où l'adhésion est importante sont localisés au domaine 3 homologue à la fibronectine type III et dans le domaine fibrinogène en C terminal (Crossin, 1996; Bélanger et Beaulieu, 1999).

Jusqu'à maintenant, aucun rôle précis n'a été attribué à la Tn-C. Des travaux de Saga et al (1992) ont démontré que l'inactivation du gène de la Tn-C chez la souris ne l'empêche pas de se développer normalement. Ces travaux ont soulevé plusieurs interrogations. Certains auteurs pensent que la Tn-C pourrait ne pas avoir de rôle fonctionnel clé alors d'autres pensent que cette perte de la Tn-C pourrait être compensée par d'autres molécules telle que la Tn-X (pour revue, voir Bélanger et Beaulieu, 1999).

L'expression et la distribution de la Tn-C a été analysée en détail dans l'intestin humain. Il est intéressant de noter que l'intestin compte parmi les quelques organes qui expriment la Tn-C chez l'adulte (Beaulieu, 1992; Riedl et al., 1992). Les sites d'expression de la Tn-C dans l'intestin grêle sont l'interface de l'épithélium-mésenchyme ainsi que les couches de cellules musculaires lisses (Beaulieu et al., 1991, 1992).

Compte tenu des propriétés adhésives et anti-adhésives de la Tn-C et de sa présence au niveau de la musculature entérique, il semble qu'elle pourrait être impliquée dans la régulation de croissance et/ou la différenciation et la survie des cellules musculaires lisses (pour revue, voir Bélanger et Beaulieu, 1999). En effet, l'analyse de la distribution de la Tn-C et de l' α -AML par double marquage, dans l'intestin grêle, au cours du développement et chez l'adulte a révélé deux caractéristiques importantes (Beaulieu et al., 1993). Premièrement, il existe une relation potentielle entre l'expression de la Tn-C et la

différenciation des cellules musculaires lisses au cours du développement. Les auteurs ont montré que l'apparition précoce de l' α -AML dans différents sites de l'intestin grêle correspond à des régions qui sont préalablement riche en Tn-C.

La seconde caractéristique est une co-distribution de l'expression de la Tn-C de l' α -AML au niveau de la muqueuse de l'intestin adulte. En effet, la majorité des sites exprimant la Tn-C sont positifs à l' α -AML. Les deux principaux sites sont les cellules musculaires et les cellules musculaires isolées de la lamina propria ainsi que la couche myofibroblastique péricryptale et sa continuité au niveau de la villosité (couche myofibroblastique sub-épithéliale).

Dans l'intestin grêle adulte, la Tn-C est exprimée au niveau de l'interface épithélium-mésenchyme selon un gradient croissant de la crypte vers la villosité (Beaulieu, 1997a; Bélanger et Beaulieu, 1999). Cette prédominance de l'expression de la Tn-C dans la région des villosités a été également observée chez la souris (Probstmeier et al., 1990). En plus, ces auteurs ont montré par analyse en microscope électronique que la Tn-C est présente au niveau de la lame basale des cellules épithéliales des villosités.

4.2.2. FIBRONECTINE CELLULAIRE

La fibronectine cellulaire est parmi les molécules les mieux caractérisées (Ruoslahti, 1989; Hynes, 1990 ; Potts et Cambell, 1994). Elle est constituée de 2 sous-unités polypeptidiques similaires attachées par 2 ponts disulfures à leurs extrémités carboxy-terminales. Contrairement à la fibronectine plasmatique, produite par les hépatocytes et

qui correspond à la forme circulante, la fibronectine cellulaire est une forme retrouvée dans la MEC et est produite par une grande variété de cellules. La fibronectine cellulaire est impliquée dans diverses fonctions cellulaires comprenant l'adhésion, la migration et la prolifération (Hynes, 1990).

Dans la muqueuse de l'intestin grêle adulte, la fibronectine est retrouvée dans la matrice interstitielle et au niveau de l'interface de l'épithélium-mésenchyme. Son expression est prédominante dans les régions associées à la prolifération des cellules épithéliales soit les cryptes (Beaulieu et al., 1991; Beaulieu, 1992). La fibronectine cellulaire est exprimée aussi au niveau des éléments cellulaires de la lamina propria entourant les cryptes ainsi que dans la lamina propria du tiers inférieur de la villosité comprenant les cellules musculaires lisses. La muscularis mucosa qui délimite la muqueuse est également un site positif à la fibronectine.

4.2.3. PROTÉOGLYCANS

Les protéoglycans sont composés d'un ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycans (GAGs), liées de façon covalente au noyau protéique de la molécule. La classification des protéoglycans est basée sur le type de chaînes de GAGs qu'ils contiennent (héparane sulfate, dermatane sulfate, chondroïtine sulfate et kératane sulfate) et sur leur localisation (extracellulaire, surface cellulaire et compartiment intracellulaire). Parmi les protéoglycans les plus caractérisés, le perlécan contenant de longues chaînes de GAGs de type héparane sulfate, est présent dans toutes les lames basales. Le syndécan contenant

des chaînes de GAGs de type chondroïtine sulfate et héparane sulfate est localisé à la surface des cellules épithéliales. Outre ces constituants spécifiques à la lame basale, d'autres protéoglycans comme la décorine pourraient être retrouvés au niveau de la membrane basilaire intestinale.

La décorine est un petit protéoglycan d'environ 40KD de type dermatan/chondroïtine sulfate de la famille riche en leucine. C'est une protéine qui possède une chaîne de glycosaminoglycan. Elle joue des rôles importants dans la MEC. Elle a la capacité de contrôler la fibrogenèse du collagène type I (Vogel et al., 1984). Elle agit également comme molécule anti-adhésive en se liant au domaine de liaison cellulaire de la fibronectine (Winnemoller et al., 1991). La décorine a une grande capacité de liaison au TGF β , ce qui l'empêche de se lier à son récepteur et par conséquent inhibe son activité biologique anti-proliférative (Border et al., 1992). Elle agit donc comme stimulateur indirect de la prolifération cellulaire. L'expression de la décorine au niveau de l'intestin grêle foetal et adulte n'a pas été encore établi. Une surexpression de la décorine a été démontrée au niveau du cancer du côlon, suggérant son implication dans la progression des tumeurs (Adany et al., 1990).

5. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

L'expression et la distribution des principaux constituants de la matrice extracellulaire sont bien documentées au niveau de l'intestin grêle normal. Il apparaît de plus en plus évident que ces molécules exercent plusieurs fonctions biologiques dans

l'intestin par le biais de récepteurs spécifiques (pour revue, voir Beaulieu, 1997a, 1997b, 1999).

Dans les maladies inflammatoires, en particulier la maladie de Crohn, plusieurs altérations se produisent au niveau de la muqueuse de l'intestin grêle telles que l'atrophie des villosités et l'hyperplasie des cryptes. Ces altérations qui résultent de l'inflammation chronique pourraient être causées par la présence abondante des cytokines pro-inflammatoires dans la lamina propria. Il semble possible que les cytokines pro-inflammatoires pourraient avoir des effets sur l'expression des molécules de la matrice extracellulaire. Afin vérifier notre hypothèse, nous avons procédé à une analyse des molécules fonctionnelles dont l'expression est différentielle le long de l'axe crypte-villosité telles que le collagène $\alpha 5(\text{IV})$, les laminines, la ténascine-C, la fibronectine cellulaire et la décorine chez les patients atteints par la MC.

L'objectif principal de cette étude est d'établir les patrons d'expression de ces différentes molécules de la lame basale et de la matrice interstitielle dans le but d'identifier la ou les molécules dont l'expression serait altérée au cours de la MC.

Jusqu'à présent, les données sur l'expression des molécules de la MEC sont encore très limitées (Bouatrouss et al., 1998). En fait la seule étude publiée rapportant une modification dans les interactions cellule-matrice est celle de McDonald (1990) démontrant une induction de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ au niveau de l'épithélium des patients atteints par la MC.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. SPÉCIMENS

Pour cette étude, deux groupes de patients ont été utilisés. Le premier groupe comprenait 11 patients (5 hommes et 6 femmes; âge : 22-40 ans), ayant subi une résection intestinale pour cause de maladie de Crohn. Parmi ces 11 patients, trois n'ont reçu aucune médication avant la chirurgie (voir tableau 1). Les spécimens obtenus de ces patients étaient issus des résections de la région iléo-cœcale. Pour chaque patient, les morceaux de la muqueuse iléale étaient pris de deux régions différentes (Crohn pairés), soit de la région inflammée (MC-I), et de la région non inflammée (MC-NI), en général adjacente à la région de la marge de résection (distante d'au moins de 10 cm de la lésion). La structure histologique de cette région non atteinte est comparable à celle de l'intestin grêle normal.

Le deuxième groupe utilisé comme contrôle, comprenait des patients atteints de d'autres pathologies non inflammatoires (obstructions, cancers, et métastases ganglionnaires). Les spécimens d'intestin grêle obtenus provenaient de la région non atteinte (zone de la marge de résection) et montraient une histologie normale. L'identification macroscopique initiale des régions inflammées et non inflammées ainsi que les marges de résection a été réalisée par les pathologistes et confirmée par la suite par une analyse des caractéristiques histologiques du tissu (voir section 1.4). Les travaux de recherche effectués lors de cette étude sur les tissus humains ont reçu l'approbation de

TABLEAU 1. Données cliniques sur les spécimens d'intestin grêle utilisés

PATIENT	ÂGE	SEXE	SEGMENT	MÉDICATION (*)				
MALADIE DE CROHN		(a)	(b)	PRED	AZATH	SZP	OLSAZ	ASACOL
				(mg/j)	(mg/j)	(mg/j)	(mg/j)	(mg/j)
1	40	M	Grêle	Aucun traitement				
2	30	F	Iléon (D)	30; 5M	-	-	-	-
3	22	M	Iléon (D)	7.5; >1A	-	-	-	-
4	31	F	Iléon (D)	300; <1A	100; 2A	-	-	-
5	26	F	Iléon (D)	-	-	500; 2A	-	-
6	31	F	Iléon (D)	10; 1A	-	-	-	-
7	37	F	Iléon (D)	-	50x2; 3M	-	250; 3M	-
8	31	F	Iléon (D)	Aucun traitement				
9	30	M	Iléon (D)	Aucun traitement				
10	22	M	Iléon (D)	(d.v); 2A	-	-	-	400x2; 2A
11	34	F	Iléon (D)	500; >10A	-	-	-	500;>10A

Légendes:

(a) M : homme, F : femme. (b) D : distal.

(*) Traitement suivi deux années avant la chirurgie. A : année, M : mois.

PRED: prednisone, AZATH: azathioprine, SZP: salazoprine, OLSAZ: Olsalazine.

(d.v) : dose variable.

déontologie de la recherche sur l'humain du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke.

2. PRÉPARATION DES TISSUS

2.1. CONGÉLATION DES TISSUS

Les fragments d'intestin grêle étaient congelés soit directement dans un tube, dans l'azote liquide et utilisés par la suite pour les analyses biochimiques (extraction de protéines, d'ARNm, etc) ou inclus dans une résine d'OCT (Optimum Cutting Temperature) (Tissue-Tek, Miles Laboratories; Elkhart, In) et congelés immédiatement dans l'azote liquide afin de bien préserver les structures cellulaires et les antigènes. Les blocs-spécimens congelés, étaient conservés à -80°C, et ensuite utilisés pour une analyse immunocytochimique.

2.2 PRÉPARATION DES BLOCS DE PARAFFINE

Les spécimens obtenus étaient fixés pendant 2 heures dans la formaldéhyde 10% neutralisée. Ensuite, la déshydratation du tissu était effectuée dans des bains successifs d'éthanol à concentrations croissantes de 2 heures chacun (70%, 80%, 85%, 95%, 100% (3 fois 1 heure)). Après le passage des lames dans trois bains successifs de toluène de 1

heure chacun, l'imprégnation (3 fois 2 heures) était effectuée dans des bains de paraffine dans l'étuve à 50°C. Les blocs étaient conservés à la température de la pièce.

3. CONFECTION DES COUPES

3.1. COUPES À CONGÉLATION

Les coupes à congélation de 2 à 3µm d'épaisseur étaient réalisées à l'aide d'un cryostat Jung Frigocut 2800N (Leica instruments; Nussloch, Allemagne) et étaient ensuite déposées sur des lames de verre silanisées (Mazia et al., 1975) puis séchées à 37°C pendant 10 min. Les lames étaient conservées à -80°C.

3.2. COUPES DE PARAFFINE

Les coupes de paraffine de 5µm d'épaisseur étaient confectionnées à l'aide d'un microtome (Americal Optical Compagny). Elles étaient déposées sur des lames silanisées et séchées à 37°C. Les lames étaient conservées à la température de la pièce.

4. DÉTECTION DES ANTIGÈNES PAR IMMUNOFLOUORESCENCE INDIRECTE

4.1. TRAITEMENT ENZYMATIQUE DES COUPES DE PARAFFINE

Le déparaffinage et le traitement enzymatique étaient effectués sur les coupes de paraffine avant d'entamer la procédure d'immunofluorescence. Le déparaffinage était réalisé dans trois bains de toluène, de 10 minutes chacun. Les coupes étaient ensuite réhydratées dans des bains d'alcool à concentrations décroissantes de 3 minutes chacun (éthanol (3 fois 5 min), 95%, 85%, 75%, 50%, 30%). Après le rinçage des lames avec une solution saline tamponnée aux ions phosphates (PBS), 2 fois 5 minutes, le traitement enzymatique était effectué avec la pronase 0.05% (DAKO, n°.S.2013) dans une chambre humide à la température de la pièce afin de rendre accessible l'antigène. La durée de traitement optimale pour révéler la desmine et l' α -AML était de 10 minutes. Les coupes étaient ensuite rincées au PBS (2 fois 5 min).

4.2 PROCÉDURE D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

La fixation des coupes à congélation se faisait par immersion dans de la paraformaldéhyde fraîchement préparée (2%, pH 8.5) pendant 60 minutes à 4°C ou avec l'acétone, le méthanol ou l'éthanol à -20°C pendant 10 minutes. La nature de la fixation dépendait de l'anticorps primaire utilisé (voir tableau 2). Les lames étaient ensuite rincées dans le PBS (3 fois 10 min) à la température de la pièce. Les étapes qui suivent ont été utilisées pour les coupes à congélation et pour les coupes de paraffine.

Le blocage des groupements aldéhydes résiduels était réalisé en incubant les lames dans une solution de PBS-Glycine pendant 45 minutes à 4°C suivi de trois lavages de 10 minutes dans le PBS. Les coupes étaient par la suite incubées dans l'agent bloquant

contenant 10% de lait en poudre sans matières grasses (``Blotto`` Johnson et al., 1984) pendant 30 minutes puis avec l'anticorps primaire dilué (voir tableau 2) dans l'agent bloquant pendant 1h. Après 3 lavages (10 min), les lames étaient ensuite incubées à l'abri de la lumière avec l'anticorps secondaire pendant 1 heure (pour détail sur les anticorps secondaires, voir section 5.2). Il est à noter que les étapes de blocage et d'incubation avec l'anticorps primaire et secondaire étaient réalisées à la température de la pièce. Les coupes étaient par la suite rincées (2 fois 10 min) dans le PBS puis colorées dans une solution d'Evan bleu (0.01% dans le PBS) et rincées de nouveau. Finalement, le montage des lames se faisait avec une solution de glycérol-PBS (9:1) contenant 0.1% de paraphénylène diamine (Johnson et De C Nogueira Araujo, 1981). La visualisation des coupes était réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence Reichert Polyvar 2 (Leica Instruments).

5. ANTICORPS UTILISÉS

5.1. ANTICORPS PRIMAIRES

Les anticorps primaires utilisés pour cette étude sont identifiés dans le tableau 2.

5.2. ANTICORPS SECONDAIRES

Selon la nature de l'anticorps primaire utilisé, l'anticorps secondaire était un anti-Ig de souris ou de lapin conjugué à la fluorescéine (Boehringer Mannheim Canada, Laval,

TABLEAU 2. Liste des anticorps primaires utilisés pour l'immunofluorescence**indirecte**

Anticorps primaire	Type (a)	Antigène	Nature de coupes (b)	Fixation (c)	Dilution	Source
TN	P	Ténascine humaine	C	PF	1/300	Chemicon. Int
TN-2	M	Ténascine humaine	P	PF	1/50	Dako
HNF 7.1	M	Fibronectine cellulaire	C	PF/A	1/100	Schæn et al., 1982
PG 40	P	Décorine	C	A	1/500	Chemicon. Int
1A4	M	α AML	C/P	PF	1/500	Sigma chemicals
2P3 M	P	Desmine	P/C	PF	prédilué	Biomeda
Anti-desmine	M	Desmine	C	A	5 μ g/ml	Boehringer
4C7	M	Chaîne α 1 lam1	C	M	1/200	Engvall et al., 1990
5H2	M	Chaîne α 2 lam2	C	M	1/100	Gibco BRL
BM2	M	Chaîne α 3 lam5	C	PFA	1/200	Rousselle et al., 1991
J-2	P	Collagène α 5(IV)	C	M	1/300	Beaulieu et al., 1994a
TS2/7	M	Intégrine humaine α 1	C	M	1/100	Hemler et al., 1987
CD49a, VLA α 1	M	Intégrine humaine α 1	C	M	10 μ g/ml	Up State biotechnology
Y9A2	M	Intégrine humaine α 9	C	M	1/500	Yasuyuki et al., 1994

Légendes :

(a) M : monoclonal, P : polyclonal.

(b) C : congélation, P : paraffine.

(c) PF : paraformaldéhyde, M : méthanol, E : éthanol, A : acétone.

Lam : laminine.

Québec), utilisé à une dilution de 1/25. Alternativement un autre anticorps secondaire de chèvre anti-souris conjugué à la fluorescéine CYII (Amersham Pharmacia, Baie d'Urffé, Québec) a été utilisé à une dilution de 1/200.

En double marquage, pour la révélation de la ténascine-C et de l' α -AML, les anticorps secondaires utilisés consistaient en un mélange de l'anti-Ig de lapin conjugué à la rhodamine et de l'anti-Ig de souris conjugué à la fluorescéine à la dilution finale de 1/25. La révélation en double marquage de la desmine et de l' α -AML se faisait respectivement avec un anti-Ig de lapin conjugué à la fluorescéine et un anti-Ig de souris conjugué à la rhodamine.

Il est à noter que les longueurs d'ondes émises par la rhodamine et le bleu Evan lors d'une excitation par la lumière ultraviolette sont semblables. Le bleu Evan n'a donc pas été utilisé lors du double marquage pour éviter son interférence avec la rhodamine.

6. ANALYSE PAR RT-PCR

6.1. EXTRACTION D'ARNs TOTAUX DES TISSUS

La préparation des ARNs totaux à partir des spécimens d'intestin grêle adulte humain a été effectuée selon le protocole de la compagnie Clontech. L'intestin congelé a été broyé dans un mortier stérile contenant de l'azote liquide afin de permettre une solubilisation facile et rapide du tissu dans la solution dénaturante. Les tissus obtenus sous forme de poudre étaient placés rapidement dans un tube contenant la solution

dénaturante de tampon d'isothiocyanate de guanidium (GTI) permettant la dissociation complète des complexes nucléosomiques. Le volume de la solution dénaturante utilisé selon le protocole dépendait du poids du tissu congelé pris au départ. L'homogénéisation du tissu se faisait à l'aide d'un appareil de type polytron (Brinkmann Instruments, Rexdale, Ont) à une vitesse placée au sixième niveau pendant 2 minutes. Par la suite, l'homogénat était vortexé et centrifugé à 4°C pendant 5 minutes à 13000xg afin de faire précipiter les débris cellulaires. Après avoir transféré les surnageants obtenus dans des tubes neufs, on ajoutait le phénol (pH 4) pour extraire (de la phase aqueuse) les lipides et surtout les protéines. Les tubes étaient vortexés pendant 1 minute et incubés 5 minutes dans la glace. Les mêmes étapes étaient réalisées mais cette fois avec le chloroforme afin de séparer la phase aqueuse contenant l'ARN de la phase organique contenant les protéines. L'homogénat était par la suite centrifugé pendant 10 minutes à 15000xg. La phase aqueuse était transférée dans d'autres tubes et une autre série d'extraction par le phénol-chloroforme était effectuée permettant ainsi la dénaturation et l'extraction des protéines de la phase aqueuse. Le surnageant obtenu, était précipité par l'ajout d'isopropanol. Ensuite, les tubes étaient incubés à 4°C pendant 10 minutes et centrifugés à 4°C pendant 5 minutes à 15000xg. Le surnageant était éliminé et le culot était lavé à l'éthanol 80%. Les tubes étaient centrifugés à 4°C pendant 5 minutes à 15000xg. Les culots étaient séchés à l'air libre et resuspendus dans l'eau sans RNAase. Les échantillons étaient dosés par spectrophotométrie (Beckman, DU 640). Les densités optiques obtenus pour les longueurs d'onde de 280nm ou 260nm permettaient de quantifier les protéines et l'ARN

respectivement . Le rapport ARN/protéines indiquait la pureté des échantillons d'ARN. Ce rapport devrai être supérieur à 1.6. Les quantités d'ARN dans chaque tube ont été déterminées en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ considérant qu'une unité de densité optique correspond à $40\mu\text{g}/\text{ml}$. Les échantillons ont été par la suite migrés sur gel d'agarose 1% afin de vérifier leur intégrité et étaient conservés à -80°C .

6.2. TRANSCRIPTION INVERSE

Les échantillons d'ARNs totaux étaient traités avec la transcriptase inverse (RT) afin d'obtenir les ADNc pour l'amplification par PCR. Le protocole suivi est celui de la compagnie GIBCO-BRL. Cinq μg d'ARN total de ces échantillons étaient incubés avec $0.5\mu\text{g}$ d'oligo pd (T)₁₂₋₁₈ (Amersham pharmacia) à 70°C pendant 10 minutes. Après une période d'incubation sur la glace de 5 minutes, la réaction était complétée avec $4\mu\text{l}$ de ``1st stand Buffer`` 5X (250mM Tris-Hcl pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl_2), avec $2\mu\text{l}$ de la solution de DTT (Dithiothreitol) 0.1 M (Gibco BRL) et avec $1\mu\text{l}$ de la solution dNTPs (10mM) contenant un mélange d'ATP, CTP, GTP, TTP. Les tubes étaient incubés à 50°C pendant 2 minutes. Par la suite, $1\mu\text{l}$ (contenant 200U) de superscript II (reverse transcriptase) (Gibco BRL, Burlington, Ontario) était ajouté et l'incubation était poursuivie pendant 50 minutes. Les tubes étaient chauffés à 70°C pendant 15 minutes pour dénaturer l'enzyme. $0.4\mu\text{l}$ de ARNase H (Pharmacia) était ajouté et les tubes étaient incubés à 37°C pendant 20 minutes. Les échantillons étaient conservés à -20°C .

6.3. RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE

Deux μl de la réaction de transcription inverse étaient utilisés pour l'amplification par PCR. Les $2\mu\text{l}$ de l'ADNc nouvellement synthétisé étaient ajoutés à la solution principale préparée à l'avance contenant les éléments suivants: $10\mu\text{l}$ de tampon pour le PCR 10X ([Tris-HCl], [KCl], $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, 15 mM MgCl_2 , pH 8.5 (20°C)), $0.5\mu\text{l}$ de l'ADN polymérase Taq (Pharmacia biotech), $2\mu\text{l}$ de la solution de dNTP de 10 mM, et $0.2\mu\text{l}$ de chacun des deux amorces sens et anti-sens. Le volume était complété à $100\mu\text{l}$ avec de l'eau traitée par DEPC (Diethyl Pyrocarbonate) afin d'inactiver l'ARNase et par conséquent protéger l'ARN de la dégradation. Les tubes étaient placés par la suite directement de 4°C à 94°C (hot start).

Les séquences amorces utilisées pour la ténascine permettant l'amplification de 230 pb (Bélanger et Beaulieu, 1999) étaient:

TN-1 Sens: 5'-CTG GTC TGA CTC TTC GTT CC-3'

TN-2 Anti-Sens: 5'-TCC TGA CAG CCG AGA AAG GC-3'

Les amorces utilisées pour la chaîne $\alpha 1$ de la laminine sont celles choisies à partir de la séquence publiée par Olson et al (1989) permettant l'amplification 327 pb étaient:

$\alpha 1$ Lam A Sens: 5'-AAG TGG CAC ACG GTC AAG AC-3'

$\alpha 1$ Lam A Anti-Sens: 5'-GAC AAG AGC TGC ATA TCC-3'

Les séquences amorces utilisées pour amplifier la chaîne $\alpha 2$ de la laminine publiée selon Vachon et al (1996) permettant l'amplification de 470 pb étaient:

HM648+ Sens: 5'-TCA AAG TAT CTG TGT CTT CAG GA-3'

HM6951- Anti-Sens: 5'-CCA GTG AAT GTA ATC ACA CGT ACA GC-3'

Les séquences amorces utilisées pour l'amplification de la chaîne $\alpha 3$ de la laminine publiée selon Ryan et al (1994) permettant l'amplification de 209 pb étaient:

$\alpha 3$ Sens: 5'-GGA CCT CAA CGT CGG TCA-3'

$\alpha 3$ Anti-Sens: 5'-CAG GGA TCC TCA GTG TCG TC-3'

Les séquences amorces pour la protéine ribosomale S14, utilisées comme contrôle interne, sont celles choisies selon Foley et al (1993) permettant l'amplification de 143 pb étaient:

S14 Sens: 5'-GGC AGA CCG AGA TGA ATC CTC A-3'

S14 Anti-Sens: 5'-CAG GTC CAG GGG TCT TGG TCC-3'

Pour la ténascine, les chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$, et $\alpha 3$ des laminines, le même programme d'amplification par PCR ``Touchdown`` (Don et al., 1991; Roux, 1995) a été utilisé. L'ADNc simple brin était amplifié par 22 à 46 cycles (le nombre de cycle est différent pour chaque molécule à analyser) de dénaturation (1 minute à 94°C) et une hybridation/extension (1 minute à 53°C et 1 minute à 72°C) dans un cycle thermique (Perkin-Elmer DNA thermal cycler Model 480, Foster City, CA) en présence de 250 μ M dNTPs et 2.5U de Taq polymérase (Qiagen, Mississauga, Ontario). Les produits de PCR étaient analysés sur gel d'agarose 1% non dénaturant dans le tampon TAE 1X (0.04M Tris acétate, 0.0001M EDTA) et visualisés par coloration au bromure d'éthidium.

7. ANALYSES STATISTIQUES

Pour les analyses quantitatives par immunofluorescence, les études statistiques sont réalisées par l'utilisation du test Anova. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM. Les comparaisons statistiques étaient effectuées par l'analyse des variances avec comparaisons multiples suivie d'un post test Tukey-Kramer. Les différences sont considérées significatives si $p < 0.05$. Pour les résultats du RT-PCR, les études statistiques étaient réalisées par l'utilisation du test Student. Les différences étaient considérées significatives si $p < 0.05$.

III. RÉSULTATS

Afin de caractériser la matrice extracellulaire au niveau de la muqueuse intestinale des patients atteints par la maladie de Crohn et d'identifier par la suite la ou les molécules dont l'expression serait altérée au cours du processus inflammatoire, une étude préliminaire par immunofluorescence indirecte a été effectuée sur des cryosections et des coupes de paraffine des spécimens d'intestin grêle de contrôle et de patients atteints par la maladie de Crohn (MC-NI versus MC-I). Les molécules choisies au départ pour cette analyse sont bien caractérisées au niveau de l'intestin grêle normal (pour revue, voir Beaulieu 1997a, 1997b, 1999).

1. OBSERVATIONS PRÉLIMINAIRES

Dans un premier temps, nous avons analysé l'expression et la distribution de diverses molécules de la lame basale (collagène $\alpha 5(\text{IV})$, laminines) et de la matrice interstitielle (Tn-C, fibronectine, décorine). Parmi ces molécules, les laminines et la Tn-C présentent un changement important au niveau de la muqueuse de l'intestin grêle des patients atteints par la maladie de Crohn. Ces résultats sont présentés en détail aux sections 2 et 3. Par ailleurs, les résultats obtenus avec les autres molécules montrent que dans la muqueuse de l'intestin grêle des patients atteints par la maladie de Crohn, l'expression de ces molécules semble peu affectée. Ainsi le collagène $\alpha 5(\text{IV})$ demeure faible dans presque tous les spécimens analysés (n=4), de manière comparable aux contrôles (non-montré). En ce qui

concerne la fibronectine cellulaire, son expression prédominante au niveau des cryptes est conservée dans les spécimens de MC-NI (n=11) et de MC-I (n=11) (non-montré).

Enfin, pour la décorine, le patron d'expression demeure inchangé dans la plupart des spécimens d'intestin de MC-NI et de MC-I analysés (n=11), à l'exception de certaines cryptes qui montrent une disparition de l'expression de la décorine au niveau de l'interface épithélium-mésenchyme dans les spécimens de MC-I. Cette réduction d'expression de décorine à la base des cryptes dans des spécimens d'intestin grêle affectés par la maladie de Crohn est illustrée plus loin (voir section 4.4).

2. ANALYSE DES LAMININES DANS L'INTESTIN GRÊLE DES PATIENTS ATTEINTS PAR LA MALADIE CROHN

2.1. EXPRESSION ET DISTRIBUTION DES CHÂÎNES α DES LAMININES LE LONG DE L'AXE CRYPTÉ-VILLOSITÉ

L'expression et la distribution des chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$, et $\alpha 3$ des laminines le long de l'axe crypte-villosité ont été étudiées par immunofluorescence indirecte sur des cryosections en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques (tableau 2). Dans les spécimens d'intestin grêle de contrôles, la chaîne $\alpha 1$ est uniformément détectée au niveau de la lame basale de l'épithélium de la villosité, de l'apex de la villosité jusqu'à la jonction crypte-villosité mais son expression est à la limite de détection dans les cryptes (Figure 2a) et ceci est également noté pour la chaîne $\alpha 3$ (non-montré). Par contre, l'expression de la

chaîne $\alpha 2$ est restreinte au niveau des cryptes avec un marquage important à la demie inférieure de la crypte (non-montré). Ces observations sont en accord avec les résultats d'études antérieures (Beaulieu et al., 1994b; Leivo et al., 1996).

Dans les spécimens d'intestin grêle de MC-NI, l'architecture des cryptes et des villosités est presque normale. Les observations pour $\alpha 2$ et $\alpha 3$ sont comparables au contrôle, l'expression de la chaîne $\alpha 2$ est confinée au niveau des cryptes (Figure 3b) alors que la chaîne $\alpha 3$ est restreinte au niveau des villosités (Figure 3c). Pour la chaîne $\alpha 1$, en plus de sa distribution au niveau de l'interface épithélium-mésenchyme de la villosité dans l'intestin normal (Figure 2a), son expression apparaît aussi soit à la demie inférieure des cryptes (Figure 3a) ou recouvre toute la crypte (Figure 2b). Cette néoexpression de la chaîne $\alpha 1$ dans les cryptes a été observée dans presque tous les spécimens d'intestin grêle de MC-NI analysés. La chaîne $\alpha 1$, contrairement à $\alpha 2$ et $\alpha 3$ est détectée également dans les éléments cellulaires de la lamina propria et dans la muscularis mucosa.

Les spécimens de MC-I présentent une structure histologique des villosités et des cryptes anormales (Figure 3d-f). Les villosités sont larges et courtes et les cryptes sont hypertrophiques. L'expression des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 3$ reste toujours présente au niveau de l'interface de l'épithélium-mésenchyme de la villosité et apparaît de nouveau dans une proportion élevée des cryptes au niveau de la lame basale (Figure 3d et 3f respectivement). Cependant, la chaîne $\alpha 2$ n'est pas détectée dans ces spécimens (Figure 3e).

Figure 2. Comparaison de la localisation de l'expression de la chaîne $\alpha 1$ de la laminine-1 dans la région des cryptes des spécimens d'intestin grêle de contrôle et de maladie de Crohn non inflammé.

La chaîne $\alpha 1$ a été révélée par immunofluorescence indirecte sur des cryosections de spécimens d'intestin grêle de contrôle (a) et de MC-NI (b). La chaîne $\alpha 1$ a été fortement exprimée à la base des cellules épithéliales le long de la villosité dans les spécimens de contrôle (a) et de MC-NI (b) mais absente au niveau de la lame basale des cryptes dans l'intestin grêle de contrôle (a) tandis qu'elle était présente dans les spécimens de MC-NI dans la plupart des cryptes selon un patron de marquage qui s'étend sur toute la crypte. La chaîne $\alpha 1$ a été détectée aussi dans les cellules musculaires lisses isolées dans la lamina propria et la muscularis mucosa dans les spécimens de contrôle et de MC-NI. Astérisque: crypte; lp : lamina propria; mm : muscularis mucosa; v : villosité. Grossissement 224X (a) et 245X (b).

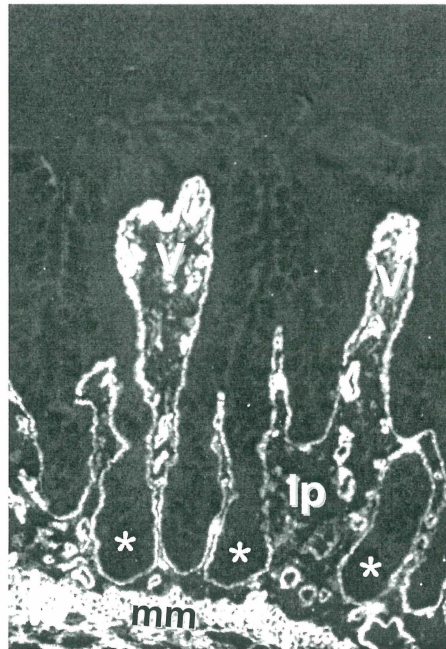
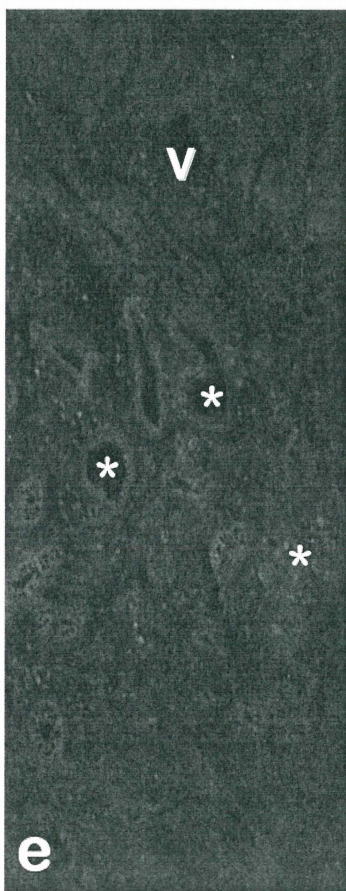
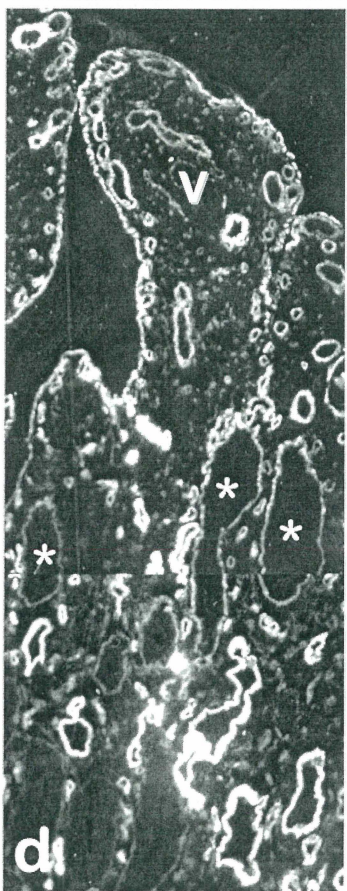
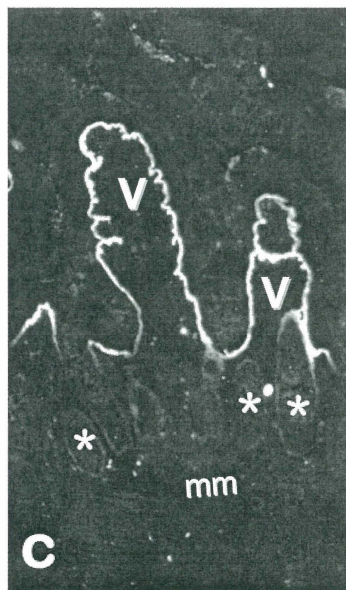
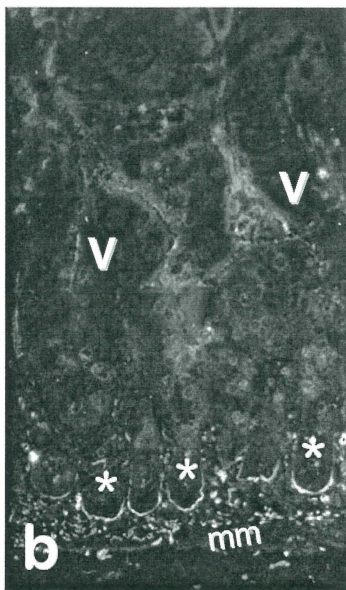
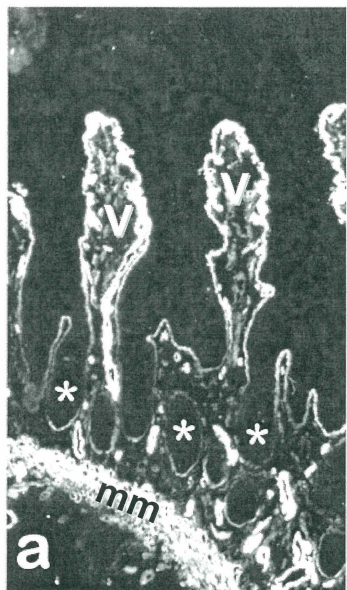


Figure 3. Expression et distribution des laminines dans la muqueuse de l'intestin grêle de patients atteints par la maladie de Crohn.

Les chaînes $\alpha 1$ (a, d), $\alpha 2$ (b, e), et $\alpha 3$ (c, f) ont été détectées par immunofluorescence indirecte sur des cryosections de spécimens de MC-NI (a-c) et de MC-I (d-e). L'expression de la chaîne $\alpha 1$ reste inchangée au niveau de l'interface épithélium-mésenchyme de la villosité aussi bien dans les spécimens de MC-NI (a) que dans MC-I (d) mais apparaît au niveau de la lame basale principalement à la demie inférieure de la crypte dans ce spécimen de MC-NI (a) et autour de toute la crypte dans les spécimens de MC-I (d). L'expression de la chaîne $\alpha 1$ est normalement absente au niveau des cryptes dans les spécimens contrôles (voir Figure 2a). L'expression de la chaîne $\alpha 2$ est restreinte à la demie inférieure des cryptes dans les spécimens de MC-NI (b) et disparaît complètement dans la lame basale des cryptes de MC-I (e). Cependant, la chaîne $\alpha 3$ dans la MC-NI est restreinte à la lame basale des villosités (c) tandis qu'elle est détectée au niveau des villosités et des cryptes dans les spécimens de MC-I (f). Astérisques : crypte; v : villosité; mm : muscularis mucosa.

Grossissement 128X (a, b, c, d, e, f)



La chaîne $\alpha 1$ reste toujours présente dans les éléments cellulaires de la lamina propria et dans la muscularis mucosa hypertrophique.

2.2. COMPARAISON QUANTITATIVE DE L'EXPRESSION DES CHAÎNES α DES LAMININES DANS LA RÉGION DES CRYPTES INTESTINALES

L'évaluation quantitative de l'expression des différentes chaînes de laminines (Figure 4) dans les cryptes au niveau de l'interface épithélium-mésenchyme montre que l'expression de la chaîne $\alpha 1$ augmente de manière significative aussi bien pour les spécimens d'intestin grêle de MC-NI que de MC-I en comparaison avec les contrôles. Par ailleurs, la chaîne $\alpha 3$ est augmentée significativement seulement dans les spécimens de MC-I. Son expression demeure faible dans la majorité des cryptes dans les spécimens de MC-NI. Cependant, la proportion des cryptes qui expriment la chaîne $\alpha 2$ baisse de manière très significative dans les spécimens de MC-I par rapport aux régions de contrôles et de MC-NI. Il est intéressant de noter que dans les spécimens de MC-NI, l'expression de la chaîne $\alpha 1$ apparaît soit à la demie inférieure de la crypte (marquage semblable à celui de la chaîne $\alpha 2$) ou s'étend à toute la crypte (voir Figure 2b et Figure 3a). L'évaluation quantitative de la proportion de ces cryptes marquées par la chaîne $\alpha 1$ montre que la proportion des cryptes qui présentent un marquage à la demie inférieure augmente significativement dans les spécimens de MC-NI par rapport au contrôle (Figure 5).

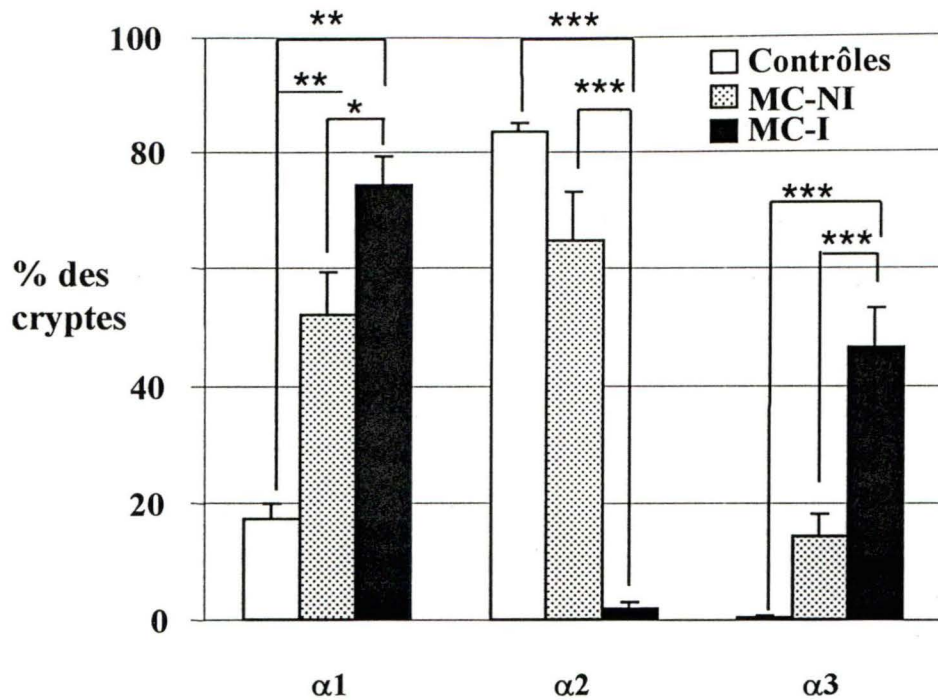


Figure 4. Analyse quantitative de l'expression des chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ des laminines dans la région des cryptes intestinales

Les proportions (en pourcentage) des cryptes qui expriment les différentes chaînes de laminines au niveau de la lame basale ont été déterminées par immunofluorescence dans la muqueuse de l'intestin grêle contrôle et de patients atteints par la MC. Le comptage a été effectué sur des sections contenant au moins 100 glandes. Les moyennes \pm SEM ont été calculées avec les valeurs en pourcentage obtenues des spécimens d'intestin grêle de contrôles (n=6) et de patients atteints par la MC (n=11) (MC-NI versus MC-I). Un exemple de minimum de marquage au niveau de la lame basale où les cryptes sont considérées comme étant positives (voir Figure 3a). Les astérisques sur les barres d'erreurs indiquent les différences statistiques significatives. * : p<0.05; ** : p<0.01; *** : p<0.001.

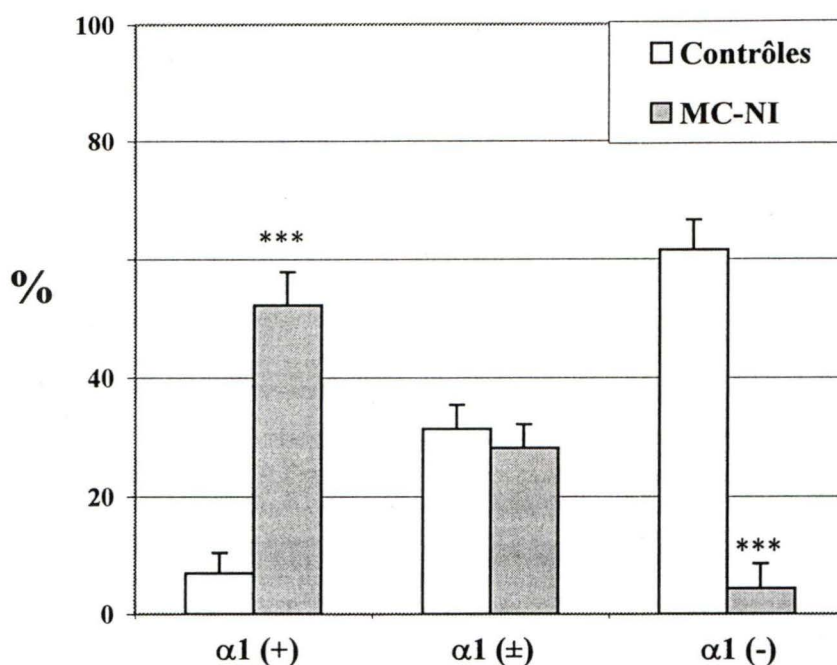


Figure 5. Expression de la chaîne $\alpha 1$ de la laminine-1 à la demie inférieure des cryptes intestinales.

L'expression de la chaîne $\alpha 1$ a été évaluée quantitativement par immunofluorescence indirecte sur des cryosections d'intestin grêle de contrôles (n=11) et de MC-NI (n=11). Le comptage d'au moins de 100 glandes a été réalisé pour chaque section analysée. Contrairement à la figure 4 où toutes les glandes ont été analysées, seules les glandes adjacentes à la muscularis mucosa (représentant la demie inférieure des cryptes) ont été considérées. Les cryptes ont été considérées positives (+) à la demie inférieure des glandes (voir Figure 3a). Les moyennes \pm SEM sont calculées à partir des valeurs de pourcentage des 11 spécimens de contrôles et de MC-NI. Les astérisques représentent les différences statistiques significatives. *** : $p < 0.001$. (\pm) : cryptes faiblement marquées; (-) : cryptes négatives.

2.3 EXPRESSION DES TRANSCRITS DES CHAÎNES α DES LAMININES

L'analyse de l'expression des transcrits des différentes chaînes α des laminines a été réalisée par RT-PCR sur 6 spécimens parmi les 11 étudiés par immunofluorescence indirecte. Les transcrits des trois chaînes sont exprimés dans tous les spécimens de MC-NI (U) et MC-I (I) (Figure 6a) y compris la chaîne $\alpha 2$. Le taux relatif de l'expression des ARNm de la chaîne $\alpha 1$ est significativement plus élevé dans les spécimens de MC-I par rapport aux spécimens de MC-NI tandis que, les transcrits des chaînes $\alpha 2$ et $\alpha 3$ restent statistiquement comparable (Figure 6b).

3. ANALYSE DE LA TÉNASCINE-C DANS LA MUQUEUSE DE L'INTESTIN GRÊLE DES PATIENTS ATTEINTS PAR LA MALADIE DE CROHN

3.1. EXPRESSION ET DISTRIBUTION DE LA TÉNASCINE-C DANS L'AXE CRYPTÉ-VILLOSITÉ

L'immunodétection de l'expression de la Tn-C le long de l'axe crypte-villosité révèle deux sites principaux d'expression dans les spécimens d'intestin grêle de contrôle (Figure 7a). Le premier site correspond à l'interface épithélium-mésenchyme des cellules épithéliales de la villosité et de la crypte et cette expression suit un gradient croissant le long de l'axe crypte-villosité. Le second site correspond aux couches musculaires lisses

Figure 6. Analyse de l'expression des transcrits des chaînes α des laminines dans l'intestin grêle des patients atteints par la maladie de Crohn (CD).

(a) Expression des transcrits des chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$, et $\alpha 3$ par RT-PCR dans des spécimens d'intestin grêle de MC-NI (U) et de MC-I (I).

-RT : Réaction sans la transcriptase inverse (RT). Les transcrits de la protéine ribosomale S14 ont été utilisés pour s'assurer de l'intégrité de l'ADNc et pour comparer la quantité d'ARN prise dans chacun des tubes pour les différents échantillons.

(b) Les taux relatifs des transcrits des chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$, et $\alpha 3$ dans des spécimens de Crohn pairés (U versus I) (n=6) ont été déterminés par rapport au S14. Les différences statistiques entre U et I a été notée pour la chaîne $\alpha 1$. * $P < 0.05$.

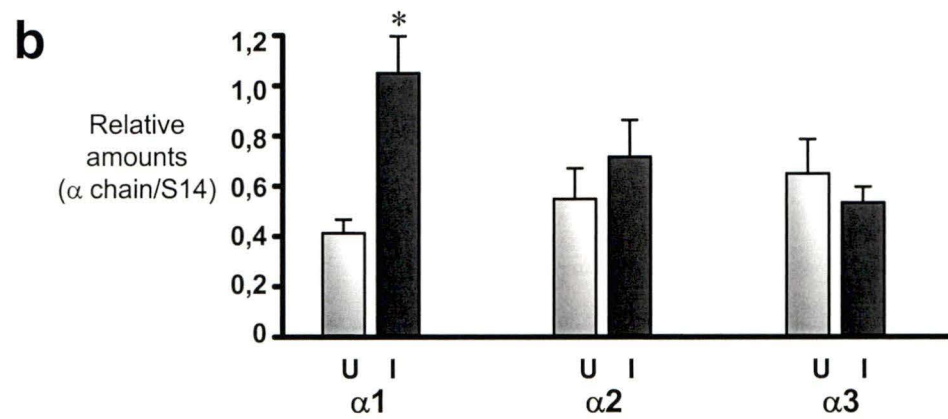
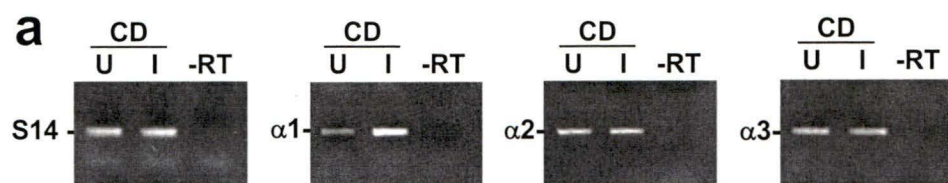


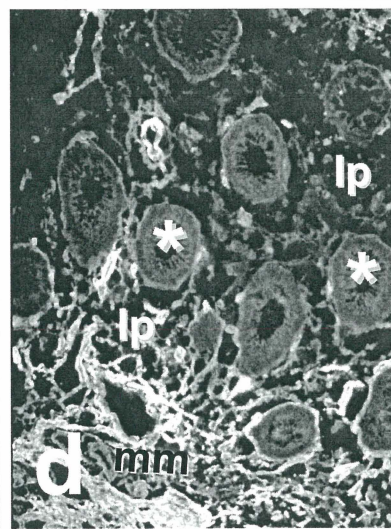
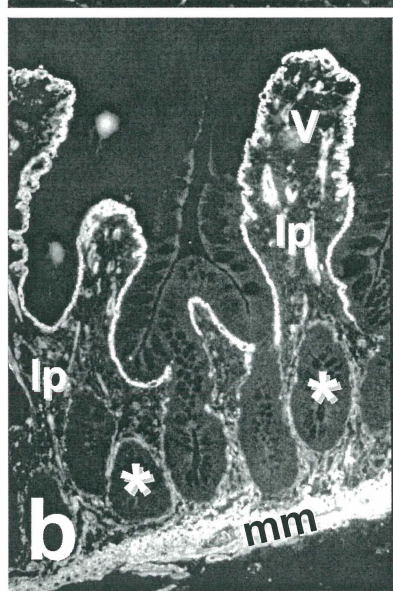
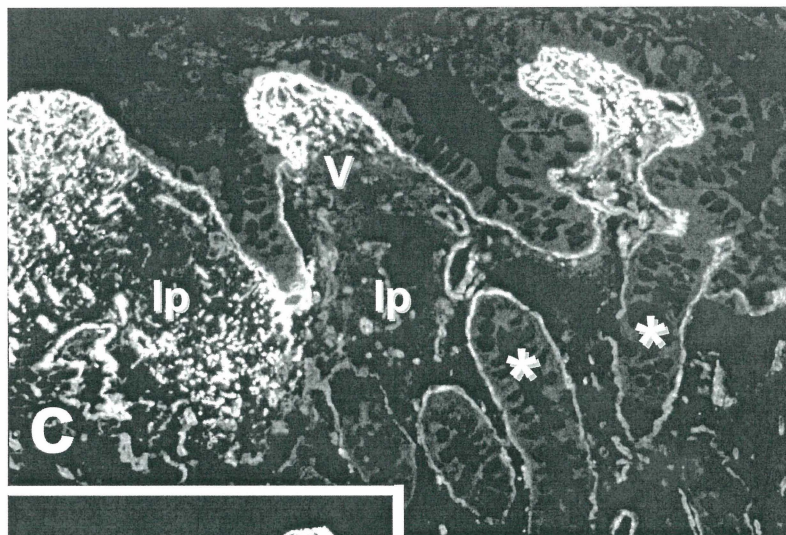
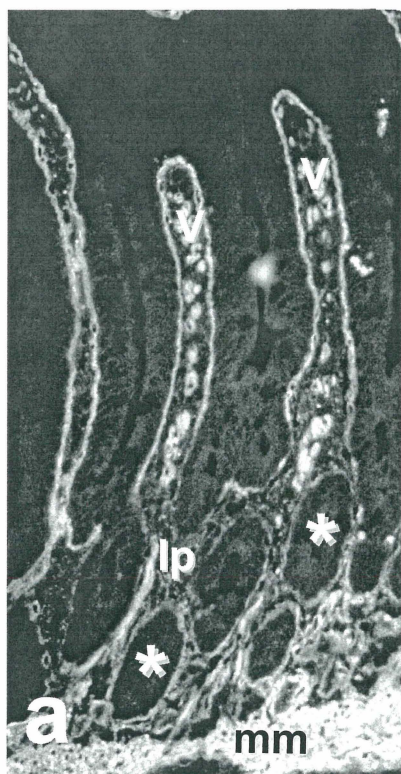
Figure 7. Expression et distribution de la ténascine-C dans la muqueuse de l'intestin grêle de contrôle et de patients atteints par la maladie de Crohn.

La Tn-C a été détectée par immunofluorescence indirecte sur des cryosections d'intestins grêle de contrôle et de Crohn pairés (MC-NI versus MC-I).

Dans l'intestin grêle normal (a), la Tn-C se retrouve prédominante de la base jusqu'à l'apex de la villosité au niveau de l'interface épithélium-mésenchyme. Du marquage spécifique et moins intense a été observé aussi en association avec la couche myofibroblastique péricryptale localisée à la base des cryptes, les cellules musculaires lisses isolées, et la muscularis mucosa. Le même patron de marquage a été observé dans les spécimens de MC-NI (b).

Dans les spécimens de MC-I (c, d), l'expression de la Tn-C est demeurée inchangée au niveau des villosités qui sont larges et courtes (c) alors qu'elle était absente dans certaines cryptes au niveau de la couche péricryptale (d). La Tn-C a été aussi détectée au niveau de la muscularis mucosa désorganisée et les cellules du muscle lisse isolées dans la lamina propria (d). Astérisques: crypte; lp : lamina propria; mm : muscularis mucosa; v : villosité. Le haut des figures a et b coïncide avec l'apex des villosités.

Grossissement 165X (a), 101X (b,d), 150X (c).



comprenant la muscularis mucosa, les éléments cellulaires de la lamina propria situés autour des cryptes et le long de l'axe crypte-villosité, comprenant les cellules musculaires lisses isolées. Ces résultats confirment les résultats des études antérieures (Beaulieu et al., 1992; Beaulieu, 1997a; Bélanger et Beaulieu, 1999).

L'analyse de l'expression et de la distribution de la Tn-C dans les spécimens de MC-NI montre que l'expression de la Tn-C demeure inchangée le long de l'axe crypte-villosité. Les deux sites majeurs d'expression de la Tn-C sont comparables à ceux observés dans les spécimens de contrôles (Figure 7b). Cependant, dans les spécimens d'intestin grêle affecté de la maladie de Crohn (Figure 7c, d), les villosités sont dans la plupart des cas larges et courtes. L'expression de la Tn-C est conservée au niveau de l'interface de l'épithélium-mésenchyme des villosités (Figure 7c) tandis que pour les cryptes, de structure généralement irrégulière, l'expression de la Tn-C est fréquemment perdue au niveau de la couche myofibroblastique péricryptale (Figure 7d). La muscularis mucosa hypertrophique et les éléments cellulaires de la lamina propria sont toujours positifs à la Tn-C (Figure 7d).

3.2. ANALYSE QUANTITATIVE DE L'EXPRESSION DE LA TÉNASCINE-C DANS LA RÉGION DES CRYPTES INTESTINALES

Afin d'évaluer l'importance de cette absence d'expression de la Tn-C au niveau de la couche myofibroblastique péricryptale dans les spécimens d'intestin grêle affectés par la maladie de Crohn en comparaison avec les spécimens contrôles, une étude quantitative par immunofluorescence indirecte a été réalisée à l'aide de comptage des cryptes marquées à la

Tn-C dans chaque section comprenant au moins une centaine de cryptes. La même procédure de comptage a été appliquée sur toutes les sections analysées. Les cryptes étaient considérées positives lorsque au moins 50% du pourtour de la crypte était marqué à la Tn-C.

Les résultats obtenus (Figure 8) montrent que la proportion des cryptes positives à la Tn-C est élevée aussi bien pour les spécimens de contrôles (98%) que pour les spécimens de MC-NI (85%). Par contre, la proportion des cryptes positives à la Tn-C baisse à environ 30% dans les spécimens de MC-I. Cette baisse d'expression de la Tn-C est statistiquement significative par rapport aux groupes de contrôle et de MC-NI ($p < 0.001$).

3.3. EXPRESSION DES TRANSCRITS DE LA TÉNASCINE-C

L'analyse des transcrits de la Tn-C (figure 9a) a été effectuée par RT-PCR sur 6 spécimens parmi les 11 étudiés par immunofluorescence. L'expression des messagers de la Tn-C reste stable dans tous les spécimens analysés. Elle est retrouvée dans tous les spécimens d'intestin grêle de MC-NI et de MC-I. Les transcrits de la Tn-C sont statistiquement comparable (Figure 9b).

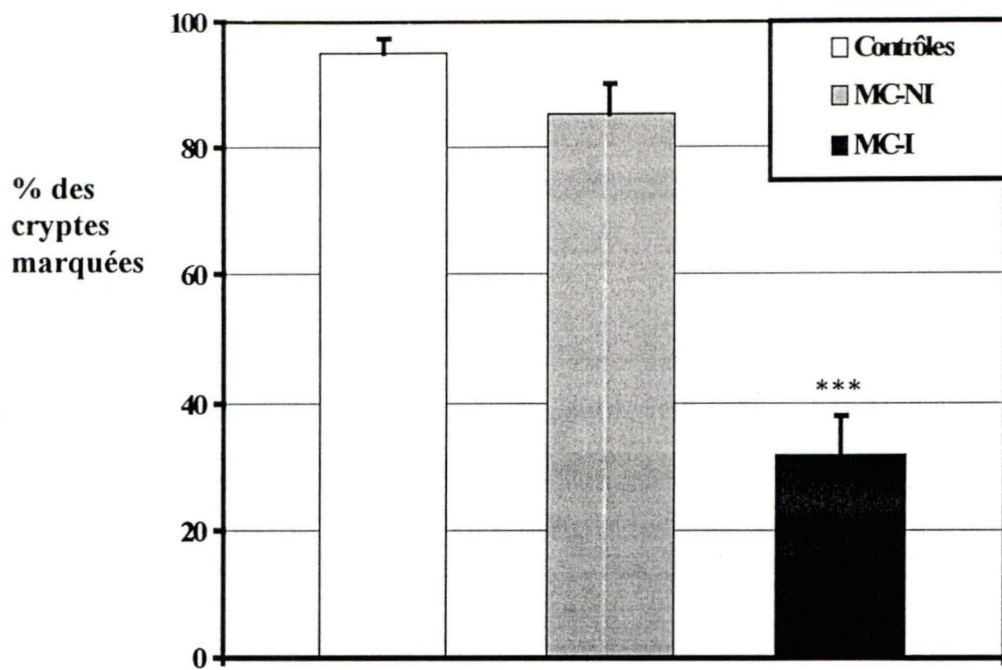


Figure 8. Expression de la ténascine-C dans la région péricryptale intestinale.

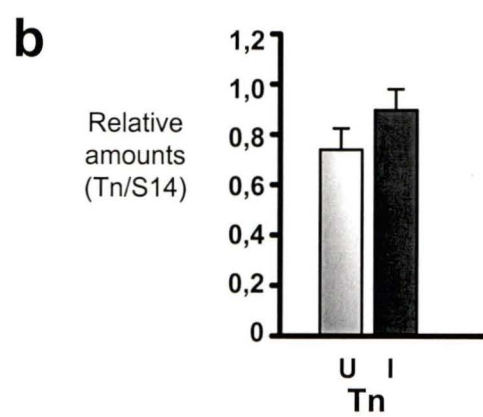
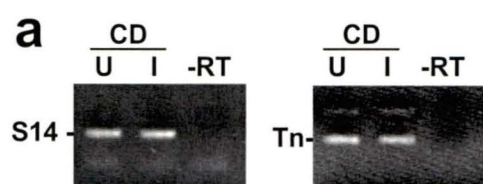
Les proportions (en pourcentage) des cryptes marquées à la Tn-C au niveau de la couche myofibroblastique péricryptale a été quantifiée par immunofluorescence indirecte dans des spécimens d'intestin grêle de contrôles et de patients atteints par la MC. Les moyennes \pm SEM sont calculées à partir des valeurs des pourcentages obtenus des cryptes positives à la Tn-C dans les spécimens d'intestin grêle de contrôles (n=11) et de Crohn pairés (n=11) analysés. Les astérisques sur les barres d'erreurs représentent les différences statistiques significatives. *** $p < 0.001$.

Figure 9. Analyse de l'expression des transcrits de la ténascine-C dans l'intestin grêle des patients atteints par la maladie de Crohn (CD).

(a) Expression des transcrits de la ténascine-C par RT-PCR dans des spécimens d'intestin grêle de MC-NI (U) et de MC-I (I).

-RT : Réaction sans transcriptase inverse (RT). Les transcrits de la protéine ribosomale S 14 ont été analysés pour s'assurer de l'intégrité de l'ADNc et pour comparer la quantité d'ARN prise dans chacun des tubes pour les différents échantillons.

(b) Les taux relatifs des transcrits de la ténascine-C dans les spécimens de Crohn pairs (U versus I) (n=6) ont été déterminés par rapport au S14. Aucune différence statistique au niveau des transcrits de la ténascine-C n'a été notée entre U et I.



4. MISE EN ÉVIDENCE DE L'ALTÉRATION DES MYOFIBROBLASTES DANS LA MUQUEUSE DE L'INTESTIN GRÊLE DES PATIENTS ATTEINTS PAR LA MALADIE DE CROHN

4.1. ANALYSE QUANTITATIVE DE L'EXPRESSION DE L' α -ACTINE DU MUSCLE LISSE DANS LA RÉGION MYOFIBROBLASTIQUE PÉRICRYPTALE

Des travaux publiés par Beaulieu et al. (1993) ont démontré que dans la muqueuse de l'intestin grêle normal, la Tn-C et l' α -AML sont distribuées dans les mêmes sites, incluant la couche myofibroblastique péricryptale. Ces observations nous ont amené à déterminer les proportions (en pourcentage) des cryptes exprimant l' α -AML dans des spécimens d'intestin grêle de contrôles (n=11) et de patients atteints par la maladie de Crohn (n=11). L'expression de l' α -AML, comme pour la Tn-C était quantifiée par immunofluorescence indirecte sur des sections comprenant au moins une centaine de glandes. Les cryptes étaient considérées positives à l' α -AML au niveau de la couche myofibroblastique péricryptale normale quand elles présentaient un marquage fin et filamenteux qui représentait au moins 50% du pourtour de la crypte. Les cryptes étaient considérées négatives dans le cas où l' α -AML était très réduite ou même absente dans la couche péricryptale et également dans les cas où on observait un marquage à l' α -AML épais et plus intense, proche de la couche péricryptale, et dont l'aspect froissé qu'on avait été préalablement attribué aux cellules musculaires lisses.

Les résultats obtenus (Figure 10) montrent une proportion très élevée de cryptes positives à l' α -AML dans les spécimens d'intestin grêle de contrôles et de MC-NI. Par contre, il y a une baisse très significative du pourcentage des cryptes qui sont positives à l' α -AML, qui atteint environ 30% dans les régions atteintes. Cette baisse d'expression d' α -AML dans les spécimens d'intestin grêle de MC-I a aussi été observée sur des sections de paraffine (n=7; données non montrées).

4.2. CO-DISTRIBUTION DE LA TÉNASCINE-C ET L' α -ACTINE DU MUSCLE LISSE DANS LA MUQUEUSE DE L'INTESTIN GRÊLE.

Afin de déterminer si la co-distribution de l' α -AML et de la Tn-C existe dans l'intestin grêle des patients atteints par la maladie de Crohn comme elle a été démontrée dans les spécimens de contrôles (Beaulieu et al., 1993), une étude par immunofluorescence indirecte, en double marquage a été effectuée, en utilisant des anticorps spécifiques à la Tn-C et à l' α -AML sur des spécimens d'intestin grêle de contrôles et de patients atteints par la maladie de Crohn. Dans l'intestin grêle de MC-NI, la co-distribution de la Tn-C et de l' α -AML est observée dans deux sites majeurs. Le premier site comprend la muscularis mucosa, et les cellules musculaires isolées situées dans la lamina propria qui sont fortement marqués par l' α -AML (Figure 11a) et la Tn-C (Figure 11b). Le second site révèle un patron de marquage fin et filamenteux avec l' α -AML localisé le long de l'axe crypte-villosité au niveau de l'interface épithélium-mésenchyme, qui correspond à la couche

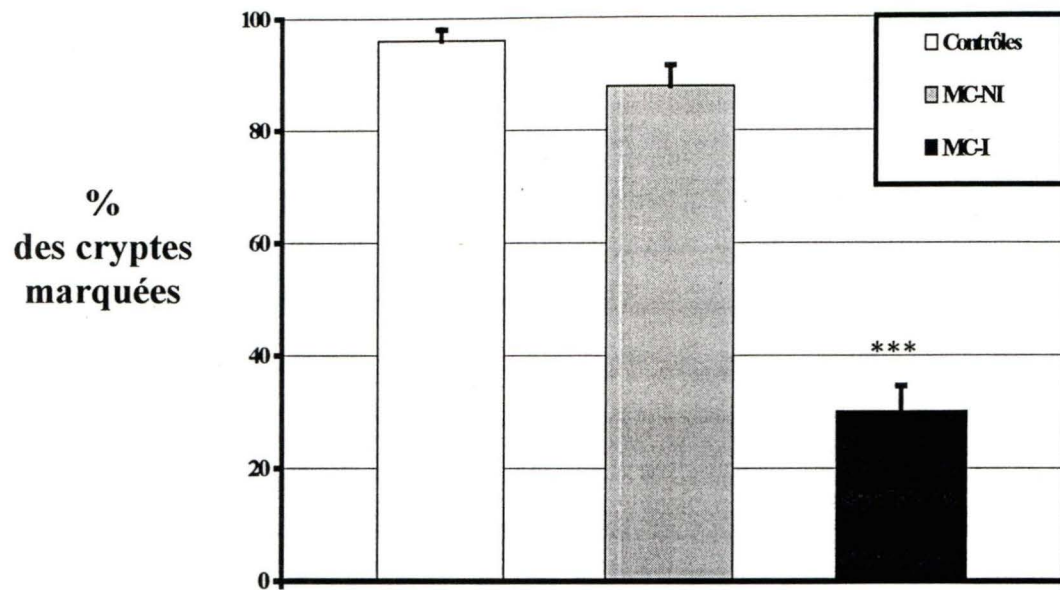
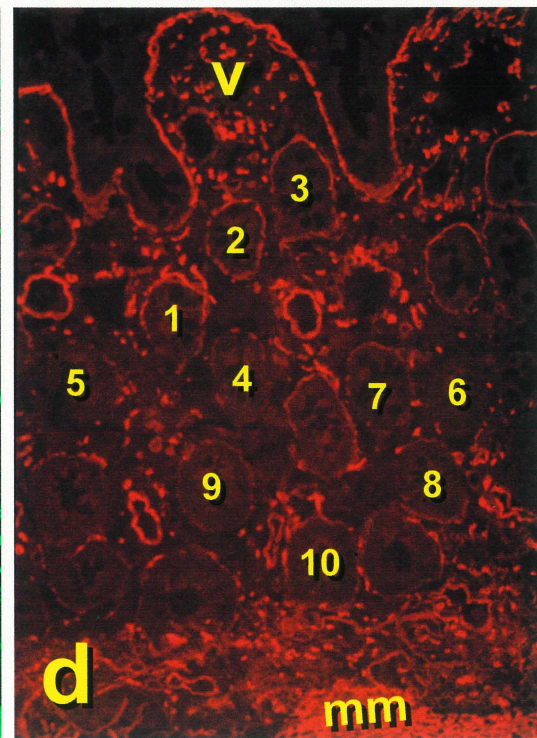
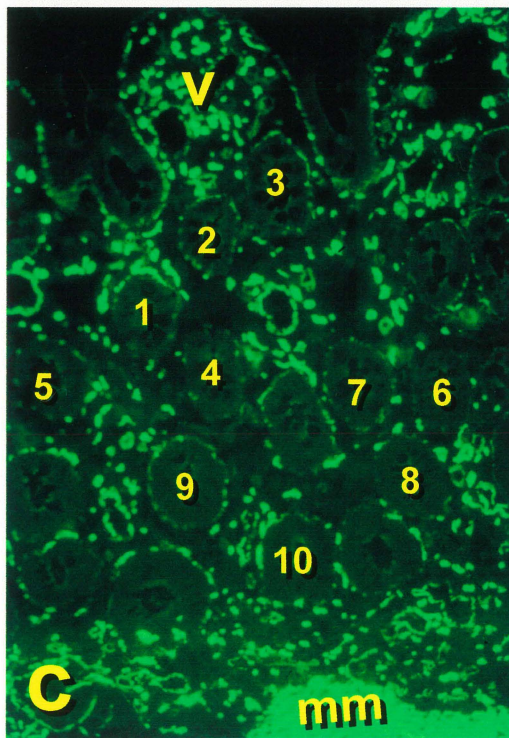
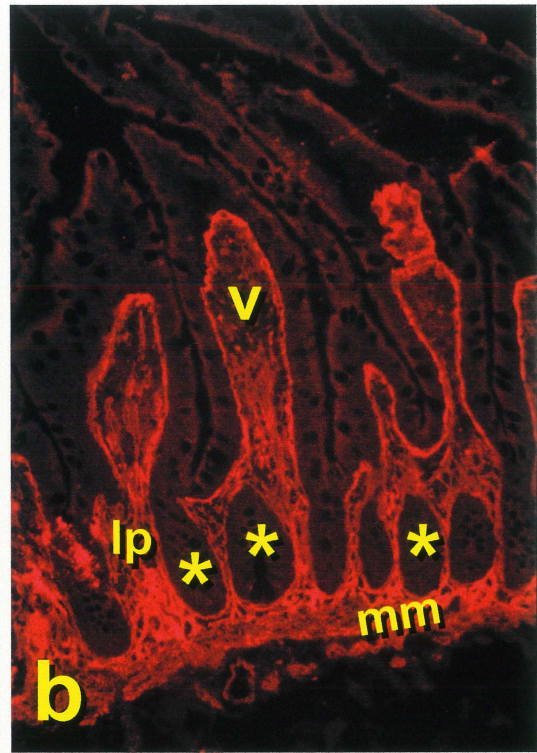
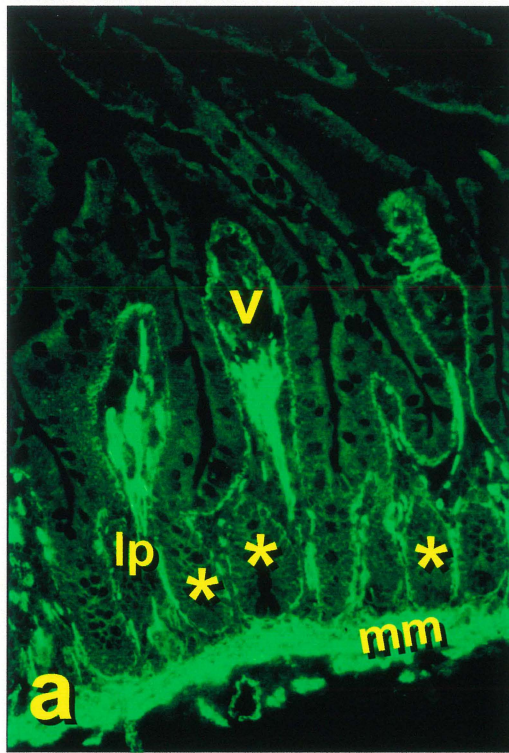


Figure 10. Expression de l' α -actine du muscle lisse au niveau de la couche myofibroblastique péricryptale.

La proportion (en pourcentage) de l'expression de l' α -AML au niveau de la couche myofibroblastique péricryptale a été quantifiée par immunofluorescence indirecte dans les spécimens d'intestin grêle de contrôles et de Crohn pairés. La présence des myofibroblastes péricryptaux a été mise en évidence par la détection l' α -AML. Les moyennes \pm SEM ont été calculées à partir des valeurs des pourcentages obtenus des cryptes positives à l' α -AML des onze spécimens de contrôles et de patients atteints de la MC. Les astérisques indiquent les différences statistiques significatives. *** $p < 0.001$.

Figure 11. Immunodétection de la Ténascine-C et de l' α -actine du muscle lisse dans la muqueuse de l'intestin grêle des patients atteints par la maladie de Crohn.

L' α -AML et la Tn-C étaient révélées par immunofluorescence indirecte en double marquage. L' α -AML était visualisée avec la fluorescéine (verte; a, c) et la Tn-C était visualisée avec la rhodamine (rouge; b, d) dans des cryosections d'intestin grêle de Crohn pairés. Dans l'intestin grêle de MC-NI (a, b), la Tn-C (b) se retrouvait à l'interface de l'épithélium-mésenchyme de la villosité et à la base de la crypte au niveau de la couche myofibroblastique péricryptale. La même localisation de marquage était observée pour l' α -AML au niveau des villosités et des cryptes (a). La muscularis mucosa ainsi que les cellules musculaires lisses isolées dans la lamina propria étaient marquées à l' α -AML (a) et étaient également des sites positifs à la Tn-C (b). Dans les spécimens de MC-I (c, d), les deux molécules étaient retrouvées co-exprimées comme dans le cas de MC-NI dans les villosités (c, d) mais disparaissaient dans les cryptes (c, d). L'expression de la α -AML et de Tn-C restait inchangée au niveau de la muscularis mucosa et les cellules musculaires lisses isolées dans la lamina propria. Comme exemple illustré avec une dizaine de cryptes (c, d) montrant les différentes possibilités de marquage à (α -AML/Tn-C) observées dans une section: les cryptes (4, 5, 6, 8) sont considérées α -AML(-)/Tn-C(-), les cryptes (1,2,3) sont α -AML(+)/Tn-C(+), la crypte (9) est α -AML(+)/Tn-C(-), et finalement la crypte (10) est α -AML(-)/Tn-C(+). Astérisques : crypte; mm : muscularis mucosa; v : villosité. Grossissement 496X (a, b), 554X (c, d).



myofibroblastique péricryptale et son extension au niveau de la villosité (couche myofibroblastique sub-épithéliale) (Figure 11a). Ce même site présente un marquage intense avec l'anticorps anti-Tn-C (Figure 11b). Il est à noter que ce patron d'expression pour l' α -AML et de la Tn-C était similaire à celui observé dans les spécimens de contrôles analysés (non-montré).

Dans les spécimens de MC-I (Figure 11c et d), l'expression de la Tn-C et de l' α -AML reste inchangée au niveau de la couche myofibroblastique subépithéliale de la villosité. Par contre, des différences notables par rapport aux spécimens de contrôles et de MC-NI ont été observées dans la région myofibroblastique péricryptale. Une absence d'expression à la fois de la Tn-C et de l' α -AML dans un nombre important de cryptes (Figure 11 c et d). Le marquage avec la Tn-C et l' α -AML est conservé au niveau de la muscularis mucosa ainsi que les éléments cellulaires de la lamina comprenant les cellules du muscle lisse autour de la crypte.

4.3. RELATION ENTRE L'EXPRESSION DE LA TÉNASCINE-C ET L' α -ACTINE DU MUSCLE LISSE

Les résultats mentionnés auparavant (Figure 8 et 10) indiquent que la proportion des cryptes négatives au niveau de la couche myofibroblastique péricryptale est aussi importante pour la Tn-C que pour l' α -AML dans les spécimens de MC-I. Une analyse quantitative par immunofluorescence indirecte, en double marquage (α -AML/Tn-C), nous

a permis de déterminer s'il existe une corrélation entre l'expression de ces 2 molécules dans les spécimens de MC-I par rapport aux contrôles et aux MC-NI.

Cette analyse a été effectuée sur des sections contenant au moins une centaine de cryptes. Pour chaque crypte, le marquage a été évalué pour la Tn-C et pour l' α -AML. Un exemple illustre les différentes possibilités de marquage pour les 2 molécules observées dans une section (voir Figure 11c, d). Nos données montrent (Figure 12) que la proportion (en pourcentage) des cryptes positives à la Tn-C et à l' α -AML est importante dans les spécimens de contrôles et de MC-NI, où elle atteint environ 85%. Par contre, dans les régions de MC-I, la proportion des cryptes négatives à la fois la Tn-C et à l' α -AML augmente de manière significative puisqu'elle atteint environ 60%.

4.4 COMPARAISON ENTRE L'EXPRESSION DE LA TÉNASCINE-C, DE LA DÉCORINE ET DE LA FIBRONECTINE DANS LA RÉGION PÉRICRYPTALE.

Dans le but de comparer l'expression de la Tn-C avec d'autres molécules de la MEC, une analyse quantitative de l'expression de la décorine et de la fibronectine au niveau de la région péricryptale a été effectuée par immunofluorescence indirecte sur des spécimens de contrôles et de patients atteints par la maladie de Crohn. Les cryptes étaient considérées positives si le marquage représentait au moins 50% du pourtour de la crypte.

Les résultats obtenus (figure 13) montrent que l'expression de la décorine demeure inchangée dans presque tous les spécimens de MC-NI en comparaison avec les contrôles.

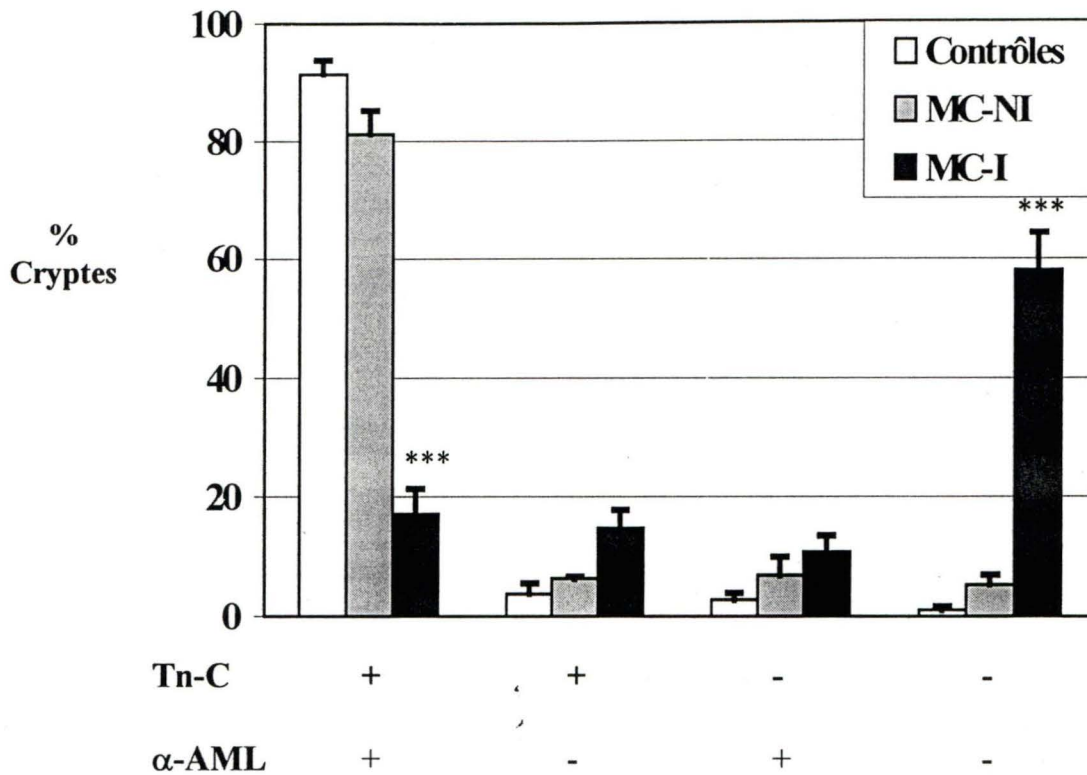


Figure 12. Relation entre l'expression de la ténascine-C et de l' α -actine du muscle lisse dans la couche myofibroblastique péricryptale intestinale.

Le pourcentage des cryptes marquées à la Tn-C et de l' α -AML a été quantifié par immunofluorescence en double marquage dans des spécimens d'intestin grêle de contrôles et de patients atteints par la MC. Le marquage a été évalué pour une même crypte à la fois pour l' α -AML et la Tn-C pour 100 cryptes au moins pour chaque section. Le comptage a été réalisé selon l'exemple illustré dans la figure 11 (c, d). Les moyennes \pm SEM ont été calculées à partir du pourcentage des cryptes positives et négatives obtenues des spécimens de contrôles (n=11) et de patients atteints par la MC (n=11) analysés. *** $p < 0.001$.

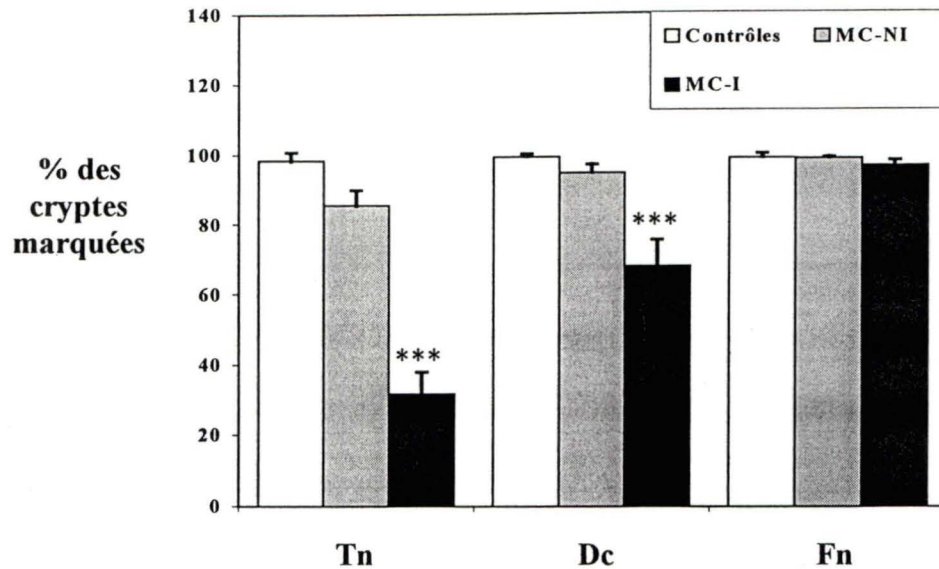


Figure 13. Comparaison de l'expression de la ténascine-C, de la décorine et de la fibronectine dans la région des cryptes intestinales.

L'expression de la Tn-C, de la Dc, et de la Fn dans la région péricryptale a été évaluée quantitativement par immunofluorescence indirecte dans des spécimens d'intestin grêle de contrôles et de patients atteints par la MC. Les moyennes \pm SEM ont été calculées à partir des valeurs en pourcentage des cryptes positives obtenues des onze spécimens contrôles et de onze spécimens de Crohn pairés (MC-NI vs MC-I). *** $p < 0.001$.

Par contre, cette expression diminue significativement dans les régions atteintes puisque 30% des cryptes sont négatives à la décorine. Cette baisse d'expression de la décorine est deux fois moins importante que celle de la Tn-C (60%).

Dans le cas de la fibronectine cellulaire, son expression dans les spécimens de MC-I au niveau de la région péricryptale reste comparable à celle des spécimens de contrôles et de MC-NI.

4.5. CONFIRMATION DE L'ALTÉRATION DES MYOFIBROBLASTES PÉRICRYPTAUX

Afin de valider la nature myofibroblastique des cellules péricryptales dans l'intestin grêle des patients atteints par la maladie de Crohn, une étude par immunofluorescence en double marquage pour la détection de l' α -AML (cellules musculaires lisses et myofibroblastes) et de la desmine (cellules musculaires seulement) a été réalisée.

Les résultats obtenus (Figure 14) montrent que dans les spécimens de MC-NI, la couche myofibroblastique péricryptale et les cellules musculaires lisses isolées sont marquées par l' α -AML (Figure 14a), alors que dans la même région seulement les cellules musculaires lisses isolées expriment la desmine (Figure 14b). Ceci confirme la nature des myofibroblastes péricryptaux. La desmine et l' α -AML ont été détectées également au niveau de la muscularis mucosa (Figure 14a et b).

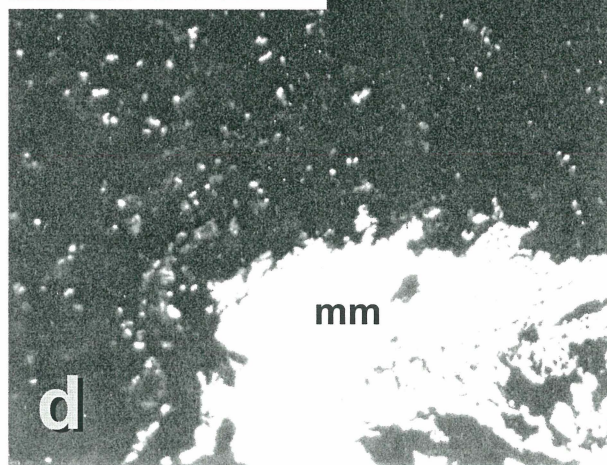
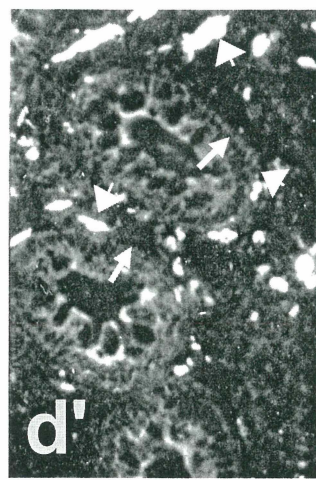
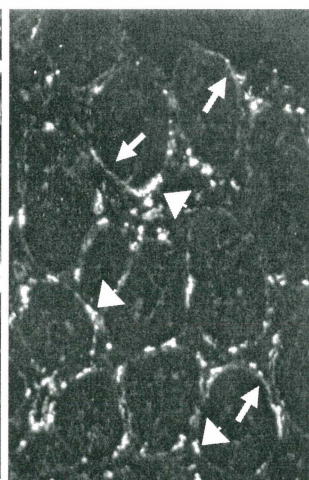
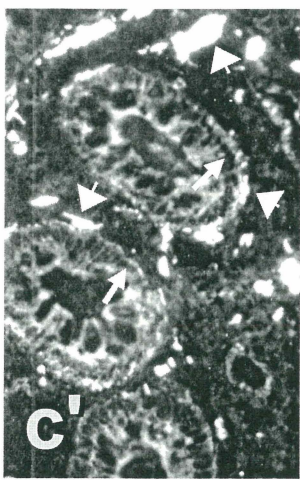
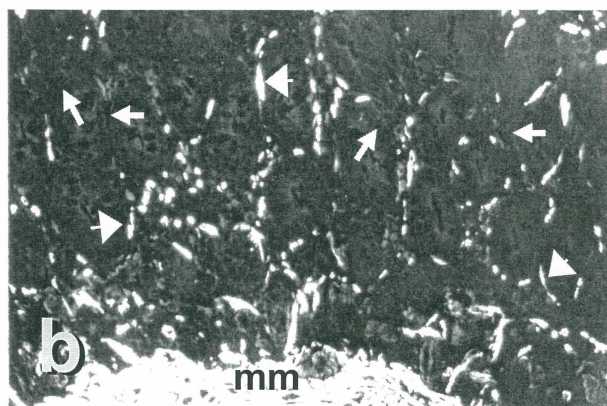
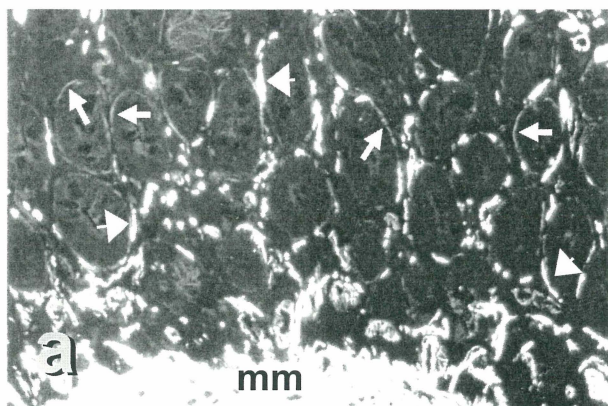
Figure 14. Immunolocalisation de l' α -actine du muscle lisse et de la desmine dans la muqueuse de l'intestin grêle des patients atteints par la maladie de Crohn.

L'expression et la distribution de l' α -AML (a, c, c') et de la desmine (b, d, d') a été révélée par immunofluorescence indirecte en double marquage sur des cryosections de spécimens de MC-NI (a, b) et de MC-I (c, c', d, d').

Dans les spécimens de MC-NI (a, b), l' α -AML (a) marquait la couche myofibroblastique péricryptale (flèches) ainsi que les cellules musculaires isolées de la lamina propria (têtes des flèches) alors que la desmine (b) ne marquait que les cellules musculaires. Ces deux molécules ont été détectées aussi au niveau de la muscularis mucosa.

Dans le cas des spécimens de MC-I (c, c', d, d'), l' α -AML identifiait la couche myofibroblastique péricryptale (flèches), qui était négative à la desmine (c, d). L' α -AML était aussi détectée dans la région péricryptale de certaines cryptes où la desmine n'était observée qu'occasionnellement et ce, uniquement à des sites où la couche péricryptale est anormalement épaisse (d, d'). Les deux molécules restaient toujours présentes au niveau de la muscularis mucosa et les cellules musculaires lisses isolées dans la lamina propria (têtes des flèches). Astérisques: crypte; mm : muscularis mucosa; v : villosité; les pointes des flèches et les flèches indiquent respectivement la couche myofibroblastique péricryptale et les cellules musculaires lisses.

Grossissement 117X (a, b), 209X (c, d), 294X (c', d').



Dans les spécimens provenant des régions de MC-I, tel que montré précédemment, l' α -AML peut être détectée ou non dans la région péricryptale (Figure 14c) alors que la desmine n'y est observée qu'occasionnellement et ce uniquement à des sites où la couche péricryptale est anormalement épaisse (Figure 14d). Les cellules musculaires isolées dans la lamina propria et la muscularis mucosa expriment l' α -AML et la desmine. Il est intéressant de noter que cet aspect anormal de la couche péricryptale n'est observé sur aucun des spécimens de MC-NI.

Pour s'assurer de la spécificité du marquage obtenu pour la desmine, deux anticorps différents ont été utilisés et ont donné des résultats similaires.

IV. DISCUSSION

Plusieurs évidences présentées dans ce travail montrent clairement que la MEC ainsi que les myofibroblastes, sont associés à l'inflammation chronique de la muqueuse de l'intestin grêle des patients atteints par la maladie de Crohn. En effet, nous avons observé : 1) une altération de l'expression des laminines; 2) une altération de l'expression de la ténascine; 3) une altération des myofibroblastes péricryptaux. Ces résultats sont en accord avec le nouveau concept de Fiocchi (1997a) qui suggère que l'inflammation intestinale implique non seulement les cellules immunes mais aussi les autres éléments cellulaires et acellulaires présents dans la lamina propria au niveau de la muqueuse intestinale.

1. IMPLICATION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DANS LE PROCESSUS INFLAMMATOIRE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS PAR LA MALADIE DE CROHN

1.1. ALTÉRATION DE L'EXPRESSION DES CHAÎNES α DES LAMININES

Nos données avec les laminines montrent trois phénomènes particuliers qui se produisent dans l'intestin provenant des patients atteints par la maladie de Crohn. Premièrement, nous avons observé une réorganisation majeure de la membrane basilaire des cryptes dans les régions de MC-I. Cette réorganisation consiste en une disparition de la laminine-2 et son remplacement par la laminine-1 et la laminine-5, tel que déduit à partir

de nos observations avec l'analyse des chaînes α correspondantes. Par contre, les chaînes $\beta 1$ et $\gamma 1$ qui sont communes à la laminine-1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$) et à la laminine-2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$) sont exprimées de manière constitutive le long de l'axe crypte-villosité comme c'est le cas dans l'intestin grêle adulte normal (Beaulieu et Vachon, 1994b; Simon-Assmann et al., 1994).

La disparition de la chaîne $\alpha 2$ combinée avec une néoexpression de la chaîne $\alpha 1$ dans les cryptes résulterait donc en une expression de la laminine-1 à ce niveau. Cependant, puisque l'anticorps 4C7 est le seul anticorps disponible dirigé contre la chaîne $\alpha 1$ humaine (Engvall et al., 1990) et que cet anticorps semble reconnaître également la chaîne $\alpha 5$ de la laminine (Tiger et al., 1997), l'expression de la laminine-10 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$) dans l'intestin grêle humain serait également possible. L'expression de la laminine-5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$) dans les cryptes dans les régions de MC-I a été déterminée par la détection de la chaîne $\alpha 3$ dans la membrane basilaire (Figure 3f) ainsi que les chaînes $\beta 3$ et $\gamma 2$ (non-montré).

Le second phénomène particulier observé dans l'intestin grêle de patients atteints par la MC concerne l'apparition de la chaîne $\alpha 1$ au niveau de la lame basale des cryptes dans les spécimens de MC-NI. C'est un phénomène rarement observé dans l'intestin grêle normal (Beaulieu et Vachon, 1994b). Il est intéressant de noter que la localisation du marquage dans la majorité des cryptes, pour la chaîne $\alpha 1$, est située à la demie inférieure des cryptes, semblable à celle observée pour la chaîne $\alpha 2$ dans les contrôles (Figure 3a; Beaulieu et Vachon, 1994b). Ces observations ont été confirmées par l'évaluation de la proportion (en pourcentage) de ces cryptes (Figure 5). Bien que cette co-distribution des 2 chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ dans la lame basale des cryptes rappelle la situation observée dans

l'intestin grêle fœtal (Simon-Assmann et al., 1994; Perreault et al., 1995), l'implication fonctionnelle de ce phénomène devra être déterminée.

Enfin, le troisième phénomène lié au processus inflammatoire est la surexpression des transcrits de la chaîne $\alpha 1$ (laminine-1) dans les régions de MC-I par rapport aux régions de MC-NI. L'augmentation de la production de molécules de la MEC dans les maladies inflammatoires digestives a été observée pour le collagène III (Stallmach et al., 1992) et la ténascine-C (Riedl et al., 1998). Ce phénomène semble être relié à l'augmentation des différents éléments cellulaires de la lamina propria comprenant les cellules du muscle lisse et les fibroblastes (Schattenfroh et al., 1994; Fiocchi., 1997a). La surexpression de la chaîne $\alpha 1$ observée dans l'intestin affecté par la MC est en accord avec les observations précédentes qui démontrent que la chaîne $\alpha 1$, contrairement aux chaînes $\alpha 2$ et $\alpha 3$, est exprimée aussi par les éléments cellulaires non-épithéliaux de la muqueuse de l'intestin grêle comprenant les cellules du muscle lisse (Beaulieu et Vachon, 1994b; Leivo et al., 1996).

1.2. ALTÉRATION DE L'EXPRESSION DE LA TÉNASCINE-C

Nos données obtenues avec la ténascine-C montrent deux phénomènes particuliers qui se produisent dans les régions de MC-I. Premièrement, nous avons observé une réduction marquée de l'expression de la Tn-C au niveau de la couche myofibroblastique péricryptale (Figure 7d et 11d), phénomène rarement observé dans les spécimens d'intestin grêle de contrôles (Figure 7a; Beaulieu et al., 1993). La perte d'expression d'une molécule

de la MEC, en plus de la laminine-2 (voir section 1.1), a été déjà reportée dans le cas des glycosaminoglycans au niveau de la lame basale sous épithéliale de l'intestin affecté de la MC (Murch et al., 1993). D'une manière générale, il apparaît que l'expression de la ténascine-C est souvent faible dans les tissus adultes mais augmentée considérablement dans des conditions pathologiques (pour revue, voir Bélanger et Beaulieu, 1999). C'est le cas, par exemple, lors de la colite ulcéreuse (Reidl et al., 1998), dans les tumeurs néoplasiques de côlon (Reidl et al., 1992), lors de la cicatrisation des blessures (Mackie et al., 1988) ainsi qu'au cours de l'arthrite rhumatoïde (McCachren et Lightner, 1992). Ces auteurs suggèrent que la Tn-C pourrait jouer un rôle dans le remodelage du tissu dans les pathologies inflammatoires ainsi que dans les tissus néoplasiques durant le développement et la progression des tumeurs.

Dans la maladie de Crohn, la réponse de l'intestin grêle à l'inflammation chronique concernant l'expression de la Tn-C semble différente par rapport aux autres pathologies inflammatoires. En effet, les résultats obtenus démontrent une réduction locale de l'expression de la ténascine-C dans la région des cryptes, au niveau de la couche myofibroblastique péricryptale de la muqueuse affectée par la MC (MC-I). Par contre, nous avons observé une surexpression de la Tn-C associée à une hyperplasie des cellules musculaires dans la majorité des spécimens étudiés. Il semble donc probable que ces changements dans l'expression de la Tn-C soient particulièrement associés au processus inflammatoire puisque seule la région atteinte présente cette anomalie de l'expression de la Tn-C.

La seconde particularité concerne l'absence de différence significative entre l'expression des transcrits de la ténascine-C dans la muqueuse affectée (MC-I) par rapport à la muqueuse non affectée (MC-NI). Ce résultat est surprenant parce qu'on s'attendait plutôt à une surexpression des messagers de la ténascine-C puisqu'au niveau protéique, l'expression de la ténascine-C est abondante dans la lamina propria et la muscularis mucosa dans la muqueuse de MC-I démontré par immunofluorescence. Ceci est à l'encontre des résultats de Riedl et al (1998) qui démontraient une élévation de l'expression de la Tn-C dans une maladie semblable, la colite ulcéreuse. Ces résultats pourraient suggérer que l'expression de la Tn-C est différente entre le côlon et l'intestin grêle et aussi entre la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. Alternativement, l'absence d'augmentation des ARNm de Tn-C pourrait suggérer l'existence d'un mécanisme posttranscriptionnel.

La récapitulation de l'ensemble de ces résultats souligne un point commun et important aux molécules de la matrice extracellulaire analysées dans ce travail. En effet, l'altération de ces molécules se produit principalement dans la région des cryptes. Ces modifications pourraient être importantes d'un point de vue fonctionnel du fait que c'est un site qui contient les cellules épithéliales souches et prolifératives, qui sont essentielles au renouvellement cellulaire (Cheng et Leblond, 1974). Cependant, il est admis aussi que la composition de la MEC adjacente aux cellules épithéliales définit un microenvironnement nécessaire pour les multiples fonctions cellulaires au cours du développement et dans l'intestin mature telles que la prolifération, la migration, et la différenciation (pour revue, voir Beaulieu, 1997a, 1997b, 1999). Il semble que dans la MC, la réorganisation des

composantes de la MEC pourrait définir un nouveau microenvironnement, lequel serait susceptible d'influencer les diverses fonctions cellulaires de l'épithélium.

2. ALTÉRATION DE LA COUCHE MYOFIBROBLASTIQUE PÉRICRYPTALE DANS LE PROCESSUS INFLAMMATOIRE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS PAR LA MALADIE DE CROHN.

Dans la crypte, comme dans la villosité, l'organisation de l'unité épithélio-mésenchymateuse est particulièrement importante du fait qu'elle est à l'origine des composantes de la MEC (Simon-Assmann et al., 1995). Il a été clairement démontré que les cellules épithéliales ou/et les myofibroblastes sont capables de produire les composantes de la lame basale (laminines, collagènes) et les composantes de la matrice interstitielle (ténascine-C, fibronectine, décorine) (pour revue, voir Beaulieu, 1997a). Aussi certaines composantes d'origine épithéliale ne sont produites que sous l'influence des myofibroblastes, tel que démontré pour un protéoglycan de type héparane sulfate ou perlécan (Vachon et al., 1993). Il apparaît donc que les myofibroblastes contribuent directement et indirectement à la composition de la MEC.

L'analyse des molécules de la MEC vis à vis de l'inflammation chronique de l'intestin a permis de distinguer deux groupes de molécules : celles qui présentent une néo-expression comme la laminine-1 et la laminine-5 et celles qui montrent une baisse ou une disparition d'expression (ténascine-C et laminine-2). Il est intéressant de noter que l'origine des molécules dans chaque groupe est la même. La laminine-1 et la laminine-5

sont produites par les cellules épithéliales et les myofibroblastes, alors que la ténascine-C et la laminine-2 sont principalement d'origine myofibroblastique (Perreault et al., 1998). Ces observations soulèvent la question suivante: l'altération de ces composantes de la MEC pourrait-elle être liée à une anomalie au niveau de son site de production? Dans ce cas la disparition de la Tn-C et de la laminine-2 suggérerait une altération de la couche myofibroblastique péricryptale. Nous avons donc étudié plus en détail ce type cellulaire.

La couche myofibroblastique péricryptale est composée de myofibroblastes, localisés autour de la crypte (Kaye et al., 1968, 1971; Sappino et al., 1989). Dans l'intestin grêle adulte, les myofibroblastes sont situés au voisinage immédiat des cellules épithéliales de la crypte (Beaulieu et al., 1993), et elles jouent un rôle important dans le maintien de la structure normale du tissu (Pascal et al., 1968, 1971). Ces cellules ont des caractéristiques ultrastructurales intermédiaires entre fibroblastes et cellules musculaires lisses (Skalli et Gabbiani, 1988; Gabbiani et al., 1971; Valentich et al., 1997). Au niveau de l'expression des protéines du cytosquelette, les myofibroblastes péricryptaux possèdent des caractéristiques de fibroblastes en exprimant la vimentine et des cellules musculaires lisses en exprimant l' α -AML. Par conséquent, on peut les associer aux myofibroblastes de type VA (pour revue, voir Powell et al., 1999a, 1999b). L'expression de l' α -AML au niveau des myofibroblastes permet de les distinguer des fibroblastes et leur attribuer la propriété de cellules contractiles (Skalli et al., 1989).

Nous avons choisi d'analyser la ténascine-C pour l'étude des myofibroblastes car des études antérieures par Beaulieu et ses collaborateurs (1993) avaient démontré l'existante

d'une co-distribution de l' α -AML avec la ténascine dans l'intestin grêle adulte. De plus la Tn-C est une molécule qui est produite exclusivement par les myofibroblastes (Perreault et al., 1998).

Dans les spécimens de l'intestin grêle affecté par la MC, les résultats obtenus soulignent deux faits très intéressants. Premièrement, le changement important de l'expression de l' α -AML dans la région péricryptale qui se traduit par une disparition marquée de la proportion des myofibroblastes péricryptaux qui expriment l' α -AML. Ces résultats suggèrent que l'absence d'expression de l' α -AML pourrait être liée à une altération ou disparition des myofibroblastes péricryptaux. L'altération des myofibroblastes péricryptaux a été précédemment reportée dans la muqueuse dysplasique à la suite d'une complication de la colite ulcéreuse (Yao et Talbot, 1996) et aussi dans le cas de la colite collagèneuse (Hwang et al., 1986). Il est pertinent de noter que dans les régions atteintes, des éléments cellulaires s'apparentant à des cellules musculaires lisses peuvent être observées en périphérie de certaines cryptes (voir Figure 14d). L'apparence de ces cellules est très différente de celle des myofibroblastes péricryptaux. En effet, le diamètre et l'intensité d'expression de l' α -AML sont beaucoup plus importants que celui des myofibroblastes péricryptaux.

Pour déterminer plus en détail la nature de ces cellules péricryptales anormales, nous avons analysé l'expression d'une autre protéine du cytosquelette : la desmine. Cette dernière est un marqueur spécifique des cellules musculaires (Sappino et al., 1990).

Dans l'intestin, la desmine est retrouvée au niveau de toutes les cellules musculaires lisses mais absente de la couche myofibroblastique péricryptale (Sappino et al., 1990; Durand, 1995), ce que nous avons confirmé avec 2 anticorps différents (voir Figure 14b).

L'analyse par immunofluorescence indirecte en double marquage des régions inflammées provenant des patients atteints par la MC montre que ces cellules péricryptales anormales sont en général négatives pour la desmine, comme c'est le cas pour les myofibroblastes péricryptaux normaux, bien qu'un marquage soit observé à l'occasion (voir Figure 14d). Ces données suggèrent que ces cellules péricryptales anormales pourraient représenter un type intermédiaire entre le myofibroblaste pericryptal typique et la cellule musculaire lisse. La plasticité entre ces 2 types cellulaires est bien documentée dans différentes pathologies comme la cirrhose du foie (pour revue, voir Desmoulière et Gabbiani, 1994; Powell et al., 1999a).

Le second fait intéressant concerne la corrélation qui existe entre l'expression de la ténascine et la présence de myofibroblastes péricryptaux normaux exprimant l' α -AML dans les régions affectées par la MC. La proportion des cryptes négatives à la fois à la ténascine et à l' α -AML est élevée. Ces données suggèrent que la baisse d'expression de la ténascine-C pourrait être liée à l'anormalité au niveau des myofibroblastes péricryptaux, mise en évidence dans la majorité des cryptes par une altération de l'expression de l' α -AML.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons analysé deux autres molécules de la MEC. La décorine, qui comme pour la ténascine-C, origine des myofibroblastes et la fibronectine

cellulaire qui est produite par les cellules épithéliales et les myofibroblastes (Vachon et al., 1993; Perreault et al., 1998). Les données obtenues confirment notre hypothèse puisque seule l'expression de la décorine est affectée. Ceci pourrait être expliqué par le fait que même si les myofibroblastes sont altérés, les cellules épithéliales peuvent continuer à produire la fibronectine cellulaire.

L'ensemble de ces résultats indique que dans la région des cryptes de spécimens de MC-I, l'expression des molécules d'origine myofibroblastique est affectée par l'anormalité des myofibroblastes tel qu'observé avec la disparition de la laminine-2 et la réduction significative de la Tn-C et de la décorine.

3. RELATION POSSIBLE ENTRE LES ANORMALITÉS DES COMPOSANTES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE ET DES MYOFIBROBLASTES AVEC LE PROCESSUS INFLAMMATOIRE.

Compte tenu de l'ensemble des résultats obtenus, deux questions pertinentes se posent. Quel mécanisme pourrait mener à l'altération des molécules de la MEC et des myofibroblastes au cours du processus inflammatoire? Que peuvent être les conséquences fonctionnelles de cette nouvelle distribution de protéines de la matrice extracellulaire au niveau de l'axe crypte-villosité?

Pour la première question, les cytokines/les facteurs de croissance, sont parmi les médiateurs solubles produits au cours du processus inflammatoire, par les éléments cellulaires et acellulaires présentes dans la lamina propria (pour revue, voir Fiocchi,

1997a). De nombreuses évidences démontrent que les cytokines, en particulier les cytokines pro-inflammatoires ainsi que les facteurs de croissance jouent un rôle clé dans la pathogenèse des maladies inflammatoires (Fiocchi et Podolsky, 1995 ; Beck et Podolsky., 1999). Le profil d'expression de ces médiateurs présente un changement important dans l'intestin affecté de la maladie de Crohn (Sher et al., 1995; Reimund et al., 1996; DiMola et al., 1999) entraînant ainsi des effets pathophysiologiques importants sur la muqueuse de l'intestin affecté des maladies inflammatoires (pour revue, voir Sartor et al., 1994). Récemment, des travaux ont démontré que la surexpression du TGF β peut avoir un effet positif sur la muqueuse de l'intestin de patients atteints par la MC. Le TGF β , en plus de son rôle dans la médiation de la voie qui mène à la régénération de la muqueuse, peut aussi contribuer à la génération des composantes de la MEC (DiMola et al., 1999). Le TGF β peut en effet affecter l'expression des gènes des différents types cellulaires comprenant les cellules épithéliales et les myofibroblastes sub-épithéliaux (Babyatsky et al., 1996).

Dans l'intestin grêle affecté de la MC, la présence importante des cytokines pro-inflammatoires dans la lamina propria, en particulier le TNF α et l'IL-1 β , peut stimuler la capacité des cellules inflammatoires à produire les métalloprotéinases (Sarén et al., 1996). Ces enzymes peuvent contribuer aux changements de la composition de la MEC (Bailey et al., 1994). Ceci pourra être considéré pour la chaîne $\alpha 2$ de la laminine, qui disparaît au niveau protéique comme démontré par immunofluorescence alors que les transcrits restent normalement exprimés.

Les cytokines peuvent également être responsables des changements qui se produisent dans les régions de MC-NI puisqu'une élévation significative des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 β , TNF α , IL-6 (Reimund et al., 1996; Dionne et al., 1997) est observée dans des biopsies de tissus histologiquement normaux. La présence de la chaîne α 1 de la laminine-1 dans la région des cryptes des spécimens de MC-NI ayant une histologie normale pourrait résulter de la présence de ces cytokines. De nombreux facteurs de croissance et de cytokines peuvent moduler l'expression de la ténascine-C dans le sens d'une surexpression ou d'une répression. Ceci a été démontré sur des tissus en culture (pour revue, voir Bélanger et Beaulieu, 1999). L'altération de l'expression de la ténascine-C observée dans les spécimens de MC-I pourrait donc être probablement médiée par un certain nombre de cytokines et de facteurs de croissance produite au cours du processus inflammatoire.

La prolifération des myofibroblastes et l'expression de l' α -AML peuvent aussi être affectées par des cytokines et les facteurs de croissance (pour revue, voir Desmoulière et Gabbiani., 1994). Ceci a été démontré sur des cultures de myofibroblastes. Par exemple, l'INF γ , qui est produit par les lymphocytes T activés par le processus inflammatoire, pourrait inhiber la prolifération des myofibroblastes et diminuer l'expression de la protéine et des messagers de l' α -AML par les myofibroblastes (Pittet et al, 1994). À l'inverse, le TGF β induit l'expression de l' α -AML par les myofibroblastes (Desmoulière et al., 1993). Ces données suggèrent qu'in vivo, la situation est relativement complexe, en tenant compte

de la diversité des différents éléments impliqués dans le processus inflammatoire (Fiocchi, 1997a).

Enfin, la MEC pourrait jouer un rôle important dans la régulation de l'inflammation intestinale. Par exemple la ténascine-C peut être impliquée dans le processus immunitaire grâce à son activité immunomodulatrice sur les lymphocytes T (Ruëgg et al., 1989). L'activation des lymphocytes T mène à une dégradation protéolytique de la MEC de la muqueuse (Pender et al., 1996). Cependant, la ténascine-C inhibe l'activation des cellules T (Hemesath et al., 1994). Ces auteurs suggèrent que l'expression de la ténascine-C *in vivo* mène à une régulation locale de la réponse immune. Elle peut par exemple protéger le tissu subissant un changement complexe pendant l'inflammation ou la régénération du tissu contre les effets non désirés des cellules T (Ruëgg et al., 1989).

Pour la seconde question concernant les conséquences fonctionnelles de la réorganisation des composantes de la MEC au niveau des cryptes, différentes hypothèses pourraient être proposées. Ainsi, le remplacement de la laminine-2 par la laminine-1 et la laminine-5 dans les cryptes des spécimens provenant de MC-I de même que la co-expression de la laminine-1 et de la laminine-2 dans les cryptes des spécimens de MC-NI pourraient avoir des conséquences fonctionnelles. En effet, il a été démontré que la laminine-1 et la laminine-2 n'exhibent pas la même capacité à moduler l'expression des gènes dans les cellules intestinales *in vitro* (Vachon et al., 1995). Cependant, les laminines médient leurs effets par le biais des récepteurs membranaires spécifiques, notamment les intégrines. Plusieurs intégrines liant les laminines ont été identifiées dans l'épithélium

intestinal normal dont $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ (Beaulieu, 1992; Basora et al., 1997; Basora et al., 1999). Ces intégrines peuvent lier différentiellement les laminines et médier des fonctions spécifiques (Mercurio, 1995; Beaulieu, 1999). Des travaux complémentaires devront donc être réalisés pour permettre de mieux comprendre, au niveau cellulaire, les implications fonctionnelles de l'altération de l'expression des laminines. Il serait donc intéressant d'analyser au niveau des cryptes dans la muqueuse de l'intestin inflammée versus non-inflammée, l'expression des marqueurs fonctionnels comme la sucrase-isomaltase, un marqueur des cellules épithéliales différenciées et le Ki69, un marqueur des cellules prolifératives. Ceci nous permettrait de savoir si les cellules cryptales sont aptes plus à se différencier ou à proliférer comparativement au contrôle.

Par ailleurs, l'intégrine $\alpha 9\beta 1$ a été identifiée comme étant un récepteur spécifique pour la ténascine-C (Yokosaki et al., 1994). Dans l'intestin grêle adulte, l'expression de cette intégrine n'est pas détectée mais des études récentes dans notre laboratoire ont démontré que l'intégrine $\alpha 9\beta 1$ est détectée dans l'intestin grêle et le côlon au cours du développement (Desloges et al., 1998) ainsi que dans les tumeurs colorectales (Basora et al., 1998). Dans les deux cas, l'expression de $\alpha 9\beta 1$ a été associée avec les cellules prolifératives. L'intégrine $\alpha 9\beta 1$ pourrait donc être impliquée dans les interactions cellulaires avec la ténascine-C au cours du développement et dans la progression des tumeurs (Bélanger et Beaulieu, 1999). Cependant, des études par immunofluorescence sur 11 spécimens de Crohn indiquent que cette intégrine demeure absente (non-montré). Cependant, un autre récepteur de la ténascine-C a été identifié récemment, l'intégrine $\alpha 8\beta 1$

(Denda et al., 1998). L'anticorps dirigé contre la chaîne $\alpha 8$ n'ayant été obtenu dans notre laboratoire que très récemment, il ne nous a pas été possible de déterminer le profil d'expression de cette intégrine dans le cadre de ce travail. Ces travaux devront se faire ultérieurement afin de d'établir s'il y a lieu, l'implication de cette intégrine $\alpha 8 \beta 1$ dans la maladie de Crohn.

Enfin, la seule intégrine dont l'expression semble altérée dans la maladie de Crohn est l'intégrine $\alpha 1 \beta 1$ (MacDonald et al., 1990). Nous n'avons pas pu confirmer ces résultats sur notre large série de spécimens de MC et ce, malgré l'utilisation de deux anticorps différents.

•
,

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La matrice extracellulaire est bien caractérisée au niveau de la muqueuse de l'intestin grêle normal. Plusieurs évidences ont démontré son importance majeure dans les différents phénomènes cellulaires tels que la prolifération, la migration, et la différenciation (pour revue, voir Beaulieu, 1997a). Cependant, très peu de données portent sur la composition de la MEC dans la pathologie inflammatoire intestinale, en particulier dans la MC (Bouatrouss et al., 1998).

L'objectif principal de cette étude était de caractériser la matrice extracellulaire de la muqueuse de l'intestin grêle des patients atteints par la MC pour identifier les molécules dont l'expression est altérée au cours du processus inflammatoire, ceci dans un contexte où les molécules de la matrice extracellulaire pourraient être impliquées dans la cascade de l'inflammation chronique intestinale (Fiocchi, 1997a).

Les résultats de ces travaux démontrent que dans la muqueuse de l'intestin grêle affecté de la maladie de Crohn, il se produit une réorganisation de la MEC dans la région des cryptes qui touche les molécules de la lame basale (laminines) et celles de la matrice interstitielle (ténascine et décorine). Cette nouvelle organisation se manifeste au niveau de la lame basale par la disparition de la laminine-2 et son remplacement par la laminine-1 et la laminine-5 et au niveau de la matrice interstitielle par une réduction de l'expression de la ténascine-C et de la décorine. Cette nouvelle organisation pourrait être considérée comme

une réponse adaptée à un environnement altéré par la présence abondante des cytokines pro-inflammatoires dans la lamina propria.

L'expression des molécules de la MEC est affectée au niveau de la région des cryptes. C'est un site particulièrement important du fait qu'il contient des cellules souches, des cellules prolifératives, et des cellules en voie de différenciation (Cheng et Leblond, 1974). À la base de ces cellules épithéliales cryptales, la composition de la matrice extracellulaire définit un microenvironnement nécessaire pour leurs multiples fonctions cellulaires. Cependant, l'altération de la composition de la matrice extracellulaire dans la MC pourrait avoir des effets sur les processus de prolifération, de migration, et de différenciation de ces cellules. Jusqu'à présent, les connaissances sont encore limitées concernant les rôles spécifiques de chacune des molécules analysées dans divers fonctions cellulaires, il est donc difficile de déterminer l'effet spécifique de l'altération de ces molécules dans la muqueuse des patients atteints par la MC.

La couche myofibroblastique péricriptale formée de myofibroblastes est le site majeur affecté par le processus inflammatoire. Les myofibroblastes peuvent contribuer directement ou indirectement à la production des molécules de la matrice extracellulaire. L'altération des myofibroblastes a été mise en évidence par l'absence d'expression de l' α -AML et l'expression de la desmine. Cette altération a des conséquences importantes sur l'expression des molécules d'origine principalement myofibroblastique. L'expression de ces molécules pourrait soit diminuer (ténascine et décorine) ou disparaître complètement (laminine-2). Pour les molécules d'origine double, qui sont produites par les cellules

épithéliales et les myofibroblastes comme la laminine-1 et la laminine-5, elles montrent plutôt une néoexpression. Il est possible que l'altération des myofibroblastes soit compensée par une production de ces molécules par les cellules épithéliales stimulées par les cytokines pro-inflammatoires.

Dans ce travail, nous avons également identifié dans la muqueuse de l'intestin affecté par la MC, la présence d'éléments cellulaires particuliers, qui s'apparentent à des cellules musculaires lisses et sont observés à la périphérie de certaines cryptes. L'apparence de ces éléments est différente de celle des myofibroblastes péricryptaux et ils expriment l' α -AML et occasionnellement la desmine. Ces données suggèrent que ces cellules péricryptales anormales pourraient représenter un type intermédiaire entre les myofibroblastes et les cellules musculaires.

L'altération des composantes de la matrice extracellulaire dans la région des cryptes se manifeste soit par une néoexpression/surexpression ou une disparition/baisse dans la muqueuse des patients atteints par la maladie de Crohn. La nouvelle organisation des composantes de la matrice extracellulaire aura probablement des conséquences fonctionnelles qui seraient médiées par le biais de récepteurs membranaires de type intégrines. Nous proposons donc une étude d'expression des intégrines liant les laminines comprenant $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, et $\alpha 6\beta 4$ qui ont été déjà analysées dans l'intestin grêle normal (Beaulieu, 1992; Basora et al., 1997,1999). Également, l'intégrine $\alpha 8\beta 1$, qui a été identifiée comme étant un récepteur de la ténascine (Denda et al., 1998), devrait être

analysée dans l'intestin grêle normal ainsi que dans la muqueuse affectée par la maladie de Crohn.

L'ensemble des résultats de notre étude soulève l'hypothèse que les altérations observées au niveau des composantes de la MEC et au niveau des myofibroblastes dans la muqueuse de l'intestin grêle affectée par la maladie de Crohn, pourrait résulter de la production locale de cytokines associées avec le processus inflammatoire.

Les altérations que nous avons identifiées pour la laminine-2, la laminine-5 et la ténascine-C au niveau des cryptes intestinales pourraient être considérées comme étant secondaires à l'inflammation puisque leur expression dans les régions de MC-NI reste comparable à celle du contrôle. Par contre, il est difficile de se prononcer concernant l'altération de la laminine-1 au fond des cryptes. Elle pourrait être considérée comme un résultat de l'inflammation. Cependant, cette altération est aussi retrouvée dans les régions non inflammées (MC-NI) qui malgré une histologie normale, sont immunologiquement actives. En effet une production importante des cytokines pro-inflammatoires est retrouvée au niveau de lamina propria de ces muqueuses intestinales (voir introduction, section 3.2.2).

Jusqu'à présent, aucune information n'a pu être établie in vivo sur des modèles animaux qui permettrait de faire la relation entre cytokines et composantes de la MEC. La complexité des interactions cellulaires et moléculaires qui se produisent au cours du processus inflammatoire y est probablement responsable (Fiocchi, 1997a). Par contre, de nombreux travaux in vitro, ont démontré l'importance des cytokines, particulièrement

celles de type pro-inflammatoires, sur la différenciation et la prolifération des fibroblastes (Fritsch et al., 1997; Moulin et al., 1998) et des cellules musculaires (Owens et Grisham, 1993). Également, l'effet des cytokines sur la production des molécules de la matrice extracellulaire a été établi in vitro sur différents types de lignées cellulaires de poumon (Elias et al., 1988; Härkönen et al., 1995), de peau (Postlethwaite et al., 1989), de foie (Ramadori et al., 1992).

Malgré l'abondance des travaux in vitro sur la détermination des effets des cytokines sur différents modèles cellulaires, on connaît encore peu de choses permettant d'établir un lien direct entre les cytokines pro-inflammatoires et la production des molécules de la MEC dans l'intestin. Par contre, grâce à un modèle déjà établi dans notre laboratoire, les cellules HIM (Human Intestinal Mesenchymal), il pourrait être intéressant d'analyser la relation entre la présence des cytokines et le phénotype myofibroblastique. En effet, l'analyse de ces cellules dérivées de l'intestin fœtal humain (Vachon et al., 1993) a révélé qu'elles possèdent un grand nombre de caractéristiques particulières aux myofibroblastes telles que l'expression des protéines du cytosquelette (la vimentine, l' α -AML mais pas la desmine). Elles peuvent également interagir avec les cellules épithéliales intestinales (Vachon et al., 1993; Perreault et Beaulieu, 1996; Durand J, 1995) et ont la capacité de produire seules ou en co-culture des molécules de la MEC telles que la ténascine-C, la fibronectine et la décorine.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr Jean-François Beaulieu, pour son assistance et son suivi tout le long de cette étude. Sa compétence et sa passion pour la recherche ainsi que son expérience dans le domaine m'ont été d'une grande utilité et m'ont permis de mener à terme ce travail. Je lui suis très reconnaissante également pour le support qu'il m'a donné dans certaines périodes difficiles au cours de mes études doctorales.

Je tiens aussi à remercier Dr Jacques Poisson du département de chirurgie générale du CHUS pour sa précieuse collaboration et l'intérêt particulier porté à mon projet de recherche.

J'adresse mes grands remerciements et mes amitiés à Dr Jean Gosselin du département de pathologie du CHUS, pour sa collaboration qui était très bénéfique pour moi. Je lui suis ainsi très reconnaissante du temps qu'il m'a consacré pour les nombreuses discussions sur l'aspect pathologique de mes travaux de recherche.

Mes remerciements s'adressent à Dr Michel Lessard, directeur de département de pathologie du CHUS, pour son aide et sa collaboration à la procuration des spécimens.

Mes remerciements s'adressent à tous les membres de jury qui ont bien voulu évaluer ce travail.

Je tiens à remercier le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche scientifique et de la formation de cadres du royaume du Maroc de m'avoir accordé un stage de longue durée pour accomplir ce travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude et ma reconnaissance à Dr Berrada Mohammed, doyen de la faculté des sciences Ben M'sik de Casablanca pour son appui et ses encouragements au cours de ces années de doctorat.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous mes collègues du département de biologie de la faculté des sciences Ben M'sik pour leur compréhension et leur soutien.

J'aimerais aussi remercier Elizabeth Herring-Gillam pour sa contribution performante dans ce travail. Je lui suis reconnaissante de son amitié sincère, son appui et ses encouragements offerts le long de mes études doctorales.

Je remercie M. Denis Martel et M. Pierre Magny pour l'aide technique offerte lors de la préparation des coupes de paraffine et pour leur assistance à la microscopie électronique.

J'adresse mes remerciements à Estelle Chamoux pour la révision du manuscrit de thèse.

Mes remerciements à tous mes amis à Sherbrooke pour leur soutien et leur encouragements.

Bien sûr, je n'oublierai pas à remercier tous les membres du laboratoire, Caroline, Carine, David, Hehong, Louis-Philippe, Michael de leur bonne collaboration et de leur sympathie.

Enfin, mes remerciements à tous le corps professoral, étudiants, et le personnel du département d'anatomie et de biologie cellulaire de leurs grandes qualités professionnelles et humaines.

BIBLIOGRAPHIE

Adany R., Heimer R., Caterson B., Sorrell J M., Iozzo R V. (1990). Altered expression of chondroitin sulfate proteoglycan in stroma of human colon carcinoma. Hypomethylation of PG-40 gene correlates with increase PG-40 content and mRNA. *J. Biol. Chem.* 265:11389-11396.

Aumailley M., Smyth N. (1998). The role of laminins in basement membrane function. *J. Anat.* 193 :1-21.

Babyatsky M.W., Rossiter G., Podolsky D.K. (1996). Expression of transforming growth factor α and β in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 110 :975-984.

Bailey C.J., Hembry R.M., Alexander A., Irving M.H., Grant M.E., Shuttleworth. C.A. (1994). Distribution of matrix metalloproteinases stromelysin, gelatinases A and B, and collagenases in Crohn's disease and normal intestine. *J. Clin. Pathol.* 47 :113-116.

Balda M S., Fallon M B., Van Itallie C M., Anderson J M. (1992). Structure, regulation, and pathophysiology of tight junctions in gastrointestinal tract. *Yale. J. Biol. Med.* 65:725-735.

Barker D.F., Hostikka S.L., Zhou J., Chow L.T., Oliphant A.R., Gerken S C., Gregory M.C., Skolnick M.H., Atkin C.L, Tryggvason K. (1990). Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science.* 248 :1224-7.

Basora N., Desloges N., Qing Chang., Bouatrouss Y., Gosselin J., Poisson J., Sheppard D., Beaulieu J.-F. (1998). Expression of the $\alpha 9 \beta 1$ integrin in human colonic epithelial cells : Resurgence of the foetal phenotype in a subset of colon cancers and adenocarcinoma cell lines. *Int. J. Cancer.* 75 :738-743.

Basora N., Herring-Gillam F.E., Boudreau F., Perreault N., Pageot L.-P., Simoneau M., Bouatrouss Y., Beaulieu J.-F. (1999). Expression of functionally distinct intergrin β 4 subunit variant in relation to the differentiated state in human intestinal cells. *J. Biol. Chem.* 274(42) :29819-29825.

Basora N., Vachon P.H., Herring-Gillam F. E., Perreault N., Beaulieu J.-F. (1997). Relation between integrin $\alpha 7 \beta 1$ expression in human intestinal cells and enterocytic differentiation. *Gastroenterology*. 113 :1510-1521.

Beaulieu J.-F. (1992). Differential expression of the VLA family of integrins along the crypt-villus axis in human small intestine. *J. Cell. Sci.* 102 : 427-436.

Beaulieu J.-F. (1997a). Expression of extracellular matrix components and integrins in relationship to intestinal epithelial cell differentiation in vivo. *Prog. Histochem. Cytochem.* 31 (4) :1-76.

Beaulieu J.-F. (1997b). Recent work with migration/patterns of expression : cell-matrix interactions in human intestinal cell differentiation. in : *The gut as model in cell and molecular biology*, (Halter F., Winton D., and Wright, N.A.,eds), pp:165-179, Kluwer, Norwel, MA

Beaulieu J.-F. (1999). Integrins and human intestinal cell functions. *Front. Biosci.* 4 :d310-d321.

Beaulieu J.-F., Vachon P. H., Herring-Gillam E., Simoneau A., Perreault N., Asselin C., Durand J. (1994a). Expression of $\alpha 5$ (VI) collagen chain in fatal small intestine. *Gastroenterology*. 107 :957-967.

Beaulieu J.-F., Jutras S., Durand J., Vachon P.H., Perreault N. (1993). Relationship between tenascin and α -smooth muscle actin expression in developing human small intestinal mucosa. *Anat. Embryol.* 188 :149-158.

Beaulieu J.-F., Vachon P.H. (1994b). Reciprocal expression of laminin A-chain isoforms along the crypt-villus axis in human small intestine. *Gastroenterology*. 106 :829-839.

Beaulieu J.-F., Vachon P.H., et Chartrand S. (1991). Immunolocalization of extracellular matrix components during organogenesis in the human small intestine. *Anat. Embryol.* 183 :363-369.

Beck P L., Podolsky D K. (1999). Growth factors in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel disease*. 5(1):44-60.

Bélanger I., Beaulieu J.-F. (1999). Tenascin in the developing and adult human intestine. *Histol. Histopathol.* (sous presse)

Bjarnason I. (1994). Intestinal permeability. *Gut. Suppl*(1):S18-S22.

Bjarnason I., Macpherson A., Hollander D. (1995). Intestinal permeability: An overview. *Gastroenterology*. 108(5):1566-1581.

Border W A., Noble N A., Yamamoto T., Harper J A., Yamaguchi Y., Pierschbacher M D., Rouslahti E. (1992). Natural inhibitor of transforming growth factor- β protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature (Lond)*. 360:361-364.

Bouatrouss Y., Poisson J., Beaulieu J.-F. (1998). Studying the basement membrane. *Methods in Disease: Investigating the gastrointestinal tract*. Edited by Preedy V.R, Watson R.R. London, Greenwich Medical Media, pp:191-200.

Bousvaros A., Stevens C., Walker W A. (1995). Intestinal host defence. In: *Inflammatory bowel disease 4^{ed}*. Edited by Kirsner J B, Shorter R J. Baltimore, Williams and Wilkins, pp:140-202.

Brandtzaeg P., Halstensen T S., Kett K., Krajci P., Kvale D., Rognum T O., Scott H., Sollid L M. (1989). Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: Humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology*. 97 :1562-84.

Brant S R., Fu Y., Fields C T., Baltazar R., Ravenhill G., Pickles M R., Rohal P M., Mann J., Kirschner B S., Jabs E W., Bayless T M., Hanauer S B., Cho J H. (1998). American families with Crohn's disease have strong evidence for linkage to chromosome 16 but not chromosome 12. *Gastroenterology*. 115(5):1056-1061.

Brynskov J., Nielsen O H., Ahnfelt -Ronne L., Bendtzen K. (1992). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol*. 27:897-906.

Burgerson R., Chiquet M., Deutzmann R., Ekblom P., Engel J., Kleinman H., Martin G.R., Meneguzzi G., Paulsson M., Sanes J., Timpl R., Tryggvason K., Yamada Y., Yurchenco P.R. (1994). A new nomenclature for laminins. *Matrix. Biol*. 14 :209-211.

Chadwick V S. (1991). Etiology of chronic ulcerative colitis and Crohn's disease. *The large intestine: Physiology, Pathophysiology, and Disease*. Edited by Phillips S F, Pemberton J H and Shorter R G. New York, Raven Press, pp:445-463.

Cheng H., Leblond C. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cells types in the mouse small intestine. V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am. J. Anat*. 141:537-562.

- Chiquet-Ehrismann R.** (1991). Anti-adhesive molecules of the extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 3:800-804.
- Chiquet-Ehrismann R.** (1993). Tenascin and other adhesion-modulating proteins in cancer. *Semin. Cancer. Biol.* 4:301-310.
- Chiquet-Ehrismann R., Hagios C., Matsumoto K.** (1994). The tenascin gene family. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 2:3-7.
- Colombel J.-F., Hugot J.-P.** (1996). Génétique de la maladie de Crohn: un modèle complexe. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 20:B15-B20.
- Crohn B B., Ginzburg J D., Oppenheimer G D.** (1932). Regional ileitis. A pathologic and clinical entity. *JAMA.* 99:1323-1332.
- Crossin K L.** (1996). Tenascin: A multifunctional extracellular matrix protein with a restricted distribution in development and disease. *J. Cell. Biochem.* 61:592-598.
- De Arcangelis A., Neuville P., Boukamel R., Lefebvre O., Keding M., Simon-Assmann.** (1996). Inhibition of laminin $\alpha 1$ -chain expression leads to alteration of basement membrane assembly and cell differentiation. *J. Cell. Biol.* 133:417-430.
- Denda S., Müller U., Crossin K L., Erickson H P., Reichardt L F.** (1998). Utilization of a soluble integrin-alkaline phosphatase chimera to characterize integrin $\alpha 8 \beta 1$ receptor interactions with tenascin: Murine $\alpha 8 \beta 1$ binds to the RGD site in tenascin-C fragments, but not to native tenascin-C. *Biochemistry.* 37:5464-5474.
- Desloges N., Basora N., Perreault N., Bouatrouss Y., Sheppard D., Beaulieu J.-F.** (1998). Regulated expression of integrin $\alpha 9 \beta 1$ in the epithelium of developing human gut and in intestinal cell lines : Relation with cell proliferation. *J. Cell. Biochem.* 71 :536-545.
- Desmoulière A., Gabbiani G.** (1994). Modulation of fibroblastic cytoskeletal features during pathological situations : The rôle of extracellular matrix and cytokines. *Cell. Motility. Cytoskeleton.* 29 :195-203.
- Desmoulière A., Geinoz A., Gabbiani F., Gabbiani G.** (1993). Transforming growth factor- $\beta 1$ induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 122:103-111.
- Di Mola F.F., Friess H., Scheuren A., Di Sebastiano P., Graber H., Egger B., Zimmermann A., Korc M., Buchler M.W.** (1999). Transforming growth factor-betas

and their signalling receptors are co-expressed in Crohn's disease. *Annal. Surg.* 229(1) :67-75.

Dionne S., Hiscott J., D'Agata L., Duhaime A., Seidman E G. (1997). Quantitative PCR analysis of TNF- α and IL-1 β mRNA levels in paediatric IBD mucosal biopsies. *Dis. Dig. Sci.* 42(7):1557-1566.

Don R H., Cox P T., Wainwright B J., Baker k., Mattick J S. (1991). ``Touchdown`` PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic. Acids. Res.* 19 :4008.

Durand J. (1995). Étude des interactions épithélio-mésenchymateuses dans un système de co-culture de cellules intestinales humaines. Mémoire de maîtrise. Département d'anatomie et de biologie cellulaire, Université de Sherbrooke.

Dvorak A M., Dickersin G R. (1979). Crohn's disease: Electron microscopic studies. *Pathol. Ann.* 14:259-306.

Dvorak A M., Dickersin G R. (1980). Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. I. Barrier function. Possible changes related to alterations of cell coat, mucous coat, Epithelial cell, and Paneth cells. *Hum. Pathol.* 1(suppl):561-571.

Elias J A., Krol R C., Freundlich B., Sampson P M. (1988). Regulation of human lung fibroblast glycosaminoglycan production by recombinant interferons, tumor necrosis factor, and lymphotoxin. *J. Clin. Invest.* 81:325-333.

Engvall E., Earwicker D., Haarparanta T., Ruoslahti E., Sanes J.R. (1990). Distribution and isolation of four laminin variants: Tissue restricted distribution of heterotrimers assembled from five different subunits. *Cell. Regul.* 1 :731-740.

Erickson H P., Bourdon M A. (1989). Tenascin:An extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 5:71-92.

Fiocchi C. (1997a). Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *Am. J. Physiol.* 273 :G769-G775.

Fiocchi C. (1997b). The immune system in inflammatory bowel disease. *Acta. Gastroenterol. Belg.* 60:156-162.

Fiocchi C. (1998). Inflammatory bowel disease: Etiology and pathogenesis. *Gastroenterology.* 115 :182-205.

Fiocchi C., Binion D G., Katz J A. (1994). Cytokines production in human gastrointestinal tract during inflammation. *Curr. Opin. Sci.* 2:639-644.

Fiocchi C., Podolsky D K. (1995). Cytokines and growth factors in inflammatory bowel disease: Inflammatory bowel disease 4^{ed}. Edited by Kirsner J B, Shorter R J. Baltimore, Williams and Wilkins, pp:252-280.

Foley K.P., Leonard M W. et Engel J.D. (1993). Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *TIG* 9(11) :380-385.

Fritsch C., Simon-Assmann P., Kedinger M. (1997). Cytokines modulate fibroblast phenotype and epithelial-stroma interactions in rat intestine. *Gastroenterology*. 112:826-838.

Gabbiani G., Ryan G.B., Majno G. (1971). Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*. 27 :549-550.

Halstensen T S., Brandtzaeg P. (1991). Local complement activation in inflammatory bowel disease. *Immunol Res.* 10 :485-92.

Härkönen E., Virtanen I., Laitinen L L., Kinnula V L. (1995). Modulation of fibronectin and tenascin production in human bronchial epithelial cells by inflammatory cytokines in vitro. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 13:109-115.

Hemesath T.J., Marton L.S., Stefansson K. (1994). Inhibition of T cell activation by extracellular matrix protein tenascin. *Immunology*. 152 :5199-5207.

Hemler M.E., Huang C et Schwarzl L. (1987). The VLA protein family. Characterisation of five distinct cell surface heterodimers each with a common 130 000 molecular weight β subunit. *J. Bio. Chem.* 262 :3300-3309.

Hoang P., Fiasse R., Van Heuverswyn R., Sibille C. (1994). Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *Acta. Gastroenterol. Belg.* VOL. LVII. 219-223.

Hollander D. (1988). Crohn's disease-a permeability disorder of the tight junction. *Gut*. 29:1621-1624.

Hollander D., Vadheim C M., Brettholz E., Delahunty T., Rotter J. (1986). Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives: A possible etiologic factor. *Ann. Intern. Med.* 105:883-885.

Howden C W., Gillanders L., Morris A J., Duncan A., Danesh B., Russell R I. (1994). Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their first-degree relatives. *Am. J. Gastroenterol.* 89(8):1175-1176.

Howden C W., Robertson C., Duncan A., Morris A J., Russel R I. (1991). Comparison of different measurements of intestinal permeability in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 86(10):1445-1449.

Hwang W S., Kelly J K., Shaffer E A., Hershfield N B. (1986). Collagenous colitis : A disease of pericryptal fibroblast sheath. *J. Pathol.* 149:33-40.

Hynes R O. (1990). Fibronectins. In *Springer Series in Molecular Biology* (Rich, A. ed). Springer-Verlag, New York.

Jacquot S., Boumsell L., Bensussan A., Modigliani R. (1994). Anomalies du système immunitaire dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 18 :945-953.

Johnson A G., Gautsch J W., Sportsman J R., Elder J H. (1984). Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitocellulose. *Gene. Anal. Tech.* 1 :3-8.

Johnson G D., de C Nogueira Araujo G M. (1981). A simple method of reducing the finding of immunofluorescence during microscpy. *J. Immunol. Methods.* 43 : 349-350.

Kaye G.I., Lane N., Pascal R.R. (1968). Colonic pericryptal fibroblast sheath : replication, migration, and cytodifferentiation of mesenchymal cell system in adult tissue. II. Fine structural aspects of normal rabbit and human colon. *Gastroenterology.* 54 :852-865.

Kaye G.I., Pascal R.R., Lane N. (1971). Colonic pericryptal fibroblast sheath : replication, migration, and cytodifferentiation of mesenchymal cell system in adult tissue. III Replication and differentiation in human hyperplastic and adenomatous polyp. *Gastroenterology.* 60 :515-536.

Kojouharoff G., Hans W., Obermeier F., Männel D N., Andus T., Schölmerich J. (1997). Neutralization of tumor necrosis factor (TNF) but not of Il-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis mice. *Clin. Exp. Immunol.* 107:353-358.

Leblond C P., Inoue S. (1989). Structure, composition, and assembly of basement membrane. *Am. J. Anat.* 185:367-390.

Lee F D., Anderson N H., Toner P G. (1997). Non-neoplastic diseases of small and large intestine. In *Principles and practice of surgical pathology and cytopathology*, 3^{ed}, Edited by Silverberg S G. Churchill livingstone, pp:1778-1780.

Leivo I., Tani T., Laitinen L., Bruns R., Kivilaakso E., Lehto V.P., Burgerson R.E., Virtanen I. (1996). Anchoring complex components laminin-5 and typeVII collagen in the intestine : Association with migration and differentiating enterocytes. *J. Histochem. Cytochem.* 44 :1267-1277.

Lotz M M., Burdsal C A., Erickson H P., McClay D R. (1989). Cell adhesion to fibronectin and tenascin:Quantitative measurements of initial binding and subsequent strengthening response. *J. Cell. Biol.* 109:1795-1805.

MacDermott R P., Lichtenstein G R., Izutani R., Muraki T. (1993). Anomalies du système immunitaire de la muqueuse au cours des maladies inflammatoires de l'intestin. *Med. Sci.* 9 :853-9.

MacDonald T.T., Horton M.A., Choy M.Y., Richman P.I. (1990). Increased expression of laminin/collagen receptor (VLA-1) on epithelium of inflamed human intestine. *J. Clin. Pathol.* 43 :313-315.

Mackie E J., Halfter W., Liverani D. (1988). Induction of tenascin in healing wounds. *J. Cell. Biol.* 107:2757-67.

Mackie E. (1997). Molecules in focus: Tenascin-C. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 29:1133-1137.

Madara J L. (1989). Loosening tight junctions. *J. Clin. Invest.* 83:1089-1094.

Marin M L., Greenstein A J., Geller S A., Godron R E., Aufses Jr A H. (1983). A freeze fracture study of Crohn's disease of terminal ileum: changes in epithelial tight junction organization. *Am. J. Gastroenterol.* 78(9): 537-547.

Mayer L., Eisenhardt D., Salomon P., Bauer W., Plous R., Piccinini L. (1991). Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 100:3-12.

Mazia D., Schatlen G., et Sale W. (1979). Adhesion of cells to surface coated with polylysine. *J. Cell. Biol.* 66 :198-200.

McCabe R B., Dean P., Elson C O. (1996). Immunology of inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 42(6) :612-620.

McCachren S.S., Lightner V.A. (1992). Expression of human téascin in synovitis and its regulation by interleukin-1. *Arthritis. Rheumatism.* 35(10);1185-1196.

Mercurio A M. (1995). Laminins receptors: achieving specificity through cooperation. *Trends. Cell. Biol.* 5:419-423.

Moulin V., gastilloux G., Auger F A., Garrel D., O'Connor-McCourt M D., Germain L. (1998). Modulated response to cytokines of human wound healing myofibroblasts compared to dermal fibroblast. *Exp. Cell. Res.* 238:283-293.

Munkholm P., Langholz E., Hollander D., Thornberg K., Orholm M., Katz K D., Binder V. (1994). Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis and their first degree relatives. *Gut.* 35:68-72.

Murch S.H., MacDonald T.T., Walker-Smith J.A., Levin M., Lionetti P., Klein N.J. (1993). Disruption of sulphated glycosaminoglycans in intestinal inflammation. *The Lancet.* 341 :711-714.

Olsen D., Nagayoshi T., Fazio M., Peltonen J., Jaakkola S., Sanborn D., Sasaki T., Kuivaniemi H., Chu M.-L., Deutzmann R., Timpl R. et Uitto J. (1989). Human laminin : cloning and sequence analysis of cDNAs encoding A, B1 and B2 chains, and expression of the corresponding genes in human skin and cultured cells. *Lab. Inv.* 60(6) :772-782.

Otto H F., Gebbers J.-O. (1981). Electron microscopic, ultracytochemical and immunohistological observations in Crohn's disease of the ileum and colon. *Virchows. Arch. A. Pathol. Anat.* 391:189-205.

Owens M W., Grisham M B. (1993). Cytokines increase proliferation of human intestinal smooth muscle cells: Possible role in inflammation-induced stricture formation. *Inflammation.* 17(4):481-487.

Pascal R.R., Lane N., Kaye G.I. (1968). Colonic pericryptal fibroblast sheath : replication, migration, and cytodifferentiation of mesenchymal cell system in adult tissue. I Autoradiographie studies of normal rabbit colon. *Gastroenterology.* 54 :835-851.

Paulsson M. (1992). Basement membrane proteins: structure, assembly and cellular interactions. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 27:93-127.

Pender S.L.F., Lionetti.P., Murch S.H., Wathan N., MacDonald T.T. (1996). Proteolytic degradation of intestinal mucosal extracellular matrix after lamina propria T cell activation. *Gut.* 39 :284-290.

Perreault N., Beaulieu J.-F. (1996). Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp. Cell. Res.* 224: 354-364.

Perreault N., Herring-Gillam F.E., Desloges N., Bélanger I., Pageot L.-P., Beaulieu.J.-F. (1998). Epithelial vs mesenchymal contribution to extracellular matrix in human intestine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 248 :121-126.

Perreault N., Vachon P.H., Beaulieu J.-F. (1995). Appearance and distribution of laminin A chain isoforms and integrin $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$ and $\beta 4$ subunits in developing human small intestinal mucosa. *Anat. Rec.* 242 : 242-250.

Pittet B., Rubbia-Brandt L., Desmoulière A., Sappino A P., Rogero P., Guerret S., Grimaud J A., Lacher R., Montandon D., Gabbiani G. (1994). Action of γ -interferon on the clinical and biologic evolution of hypertrophic scars and Dupuytren's disease:An open pilot study. *Plast. Reconstr. Surg.* 93:1224-1235.

Podolsky D K. (1991). Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 325 :928-37.

Postlethwaite A E., Smith Jn G N., Lachman L B., Endres R O., Poppleton H M., Hasty K A., Seyer J M., Kang A H. (1989). Stimulation of glycosaminoglycan synthesis in cultured human dermal fibroblasts by interleukin 1. *J. Clin. Invest.* 83:629-636.

Potts J R., Campell I D. (1994). Fibronectin structure and assembly. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 6:648-655.

Powell D W., Mifflin R C., Valentich J D., Crowe S E., Saada J I., West A B. (1999a). Myofibroblasts I. Paracrine cells important in health and disease. *Am. J. Physiol.* 277(46):C1-C19.

Powell D W., Mifflin R C., Valentich J D., Crowe S E., Saada J I., West A B. (1999b). Myofibroblasts II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am. J. Physiol.* 277(46):183-201.

Probstmeier R., Martini R., Schachner M. (1990). Expression of J1/tenascin in crypt-villus unit of adult mouse small intestine: implication for its role in epithelial cell shedding. *Development*. 109:313-321.

Ramadori G., Knittel T., Odenthal M., Schwögler., Neubauer K., Meyer Zum Büschenfelde K.-H. (1992). Synthesis of cellular fibronectin by rat liver fat-storing (Ito) cells: Regulation by cytokines. *Gastroenterology*. 103:1313-1321.

Reimund J.M., Wittersheim C., Dumont S., Muller C.D., Kenney J.S., Baumann R., Poindron P., Duclos B. (1996). Increased production of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-6 by morphological normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut*. 39 :684-689.

Riedl S E., Faissner A., Schlag P., Herbay A V., Koretz K., Möller P. (1992). Altered content and distribution of tenascin in colitis, colon adenoma, colorectal carcinoma. *Gastroenterology*. 103:400-406.

Riedl S., Kadmon M., Tandara A., Hinz U., Moller P., Herfarth C., Faissner A. (1998). Mucosal tenascin C content in inflammatory and neoplastic diseases of large bowel. *Dis. Colon. Rectum*. 41 :86-92.

Rogers A., Hurwitz L. (1998). Crohn's disease. *Clin. Persp. Gastroenterol*. 1(1):47-59.

Rousselle P., Lunstrum G.P., Keene D.R., Burgeson R.E. (1991). Kalinin : an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J. cell. Biol*. 114 :567-576.

Roux K H. (1995). Optimization and troubleshooting in PCR. In *PCR Primer : A laboratory manuel*. Edited by Dieffenbach C W and Dveksler G S. pp :53-62.

Rubin E., Farber J L. (1990). The gastrointestinal tract. In: *Essential of pathology*, 3^{ed}, Edited by Rubin E., Farber J L. J. B. Lippincott compagny. Philadilphia, pp:352-394.

Rüegg C.R., Chiquet-Ehrismann R., Alkan S.S. (1989). Tenascin, an extracellular matrix protein, exerts immunomodulatory activities. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 86 :7437-7441.

Ruoslahti E. (1988). Fibronectin and its receptors. *Ann. Rev. Biochem*. 57:375-413.

Ryan M C., Tizard R., VanDevanter D R., Carter W G. (1994). Cloning of lamA3 gene encoding the $\alpha 3$ chain of adhesive ligand epiligrin. Expression in wound repair. *J. Biol. Chem.* 269:22779-22787.

Saga Y., Yagi T., Ikawa Y., Sakakura T., Aizawa S. (1992). Mice develop normally without tenascin. *Gene. Dev.* 6:1821-1831.

Sage E H., Bornstein P. (1991). Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. *J. Biol. Chem.* 270:8650-8654.

Sappino A P., Schürch W., Gabbiani G. (1990). Biology of disease : Differentiation repertoire of fibroblastic cells: Expression of cytosquelettal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab. Invest.* 36: 144-161.

Sappino A.-P., Dietrich P.-Y., Skalli O., Widgren S., Gabbiani G. (1989). Colonic pericryptal fibroblasts. Differentiation pattern in embryogenesis and phenotypic modulation in epithelial proliferative lesions. *Virchows. Archiv. A. Pathol. Anat.* 415:551-557.

Sarèn P., Welgus H.G., Kovanen P.T. (1996). TNF α et Il-1 β selectively induce expression of 92-Kda gelatinase by human macrophages. *J. Immunol.* 157 :4159-4165.

Sartor R B. (1995). Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 24:475-507.

Sartor R.B. (1994). Cytokines in intestinal inflammation : Pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology.* 106 :533-539.

Schaen R.C., Bentley K.L., Klebe R.J. (1982). Monoclonal antibody against human fibronectin which inhibits cell attachment. *Hybridoma.* 1:99-108.

Schattenfroh S., Bartels M., Nagel E. (1994). Early morphological changes in Crohn's disease. *Acta. Anat.* 149 :237-246.

Schreiber S., Raedler A., Stenson W F., MacDermott R P. (1992). The role of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* 21(2):451-502.

Sher M E., D'Angelo A J., Stein A T., Bailey B. (1995). Cytokines in Crohn's colitis. *Am. J. Surg.* 169:133-36.

Simon-Assmann P., Duclos B., Orian-Rousseau V., Arnold C., Mathelin C., Engvall E., Keding M. (1994). Differential expression of laminin isoforms and $\alpha 6\beta 4$ integrins subunits in the developing human and mouse intestine. *Dev. Dyn.* 201:71-85.

Simon-Assmann P., Keding M., DeArchangelis A., Rousseau V., Simo P. (1995). Extracellular matrix components in intestinal development. *Experientia.* 51:883-900.

Simoneau A., Herring-Gillam F.E., Vachon P.H., Perreault N., Basora N., Bouatrouss Y., Pageot L.-P., Zhou J., Beaulieu J.-F. (1998). Identification, distribution, and tissular origin of the $\alpha 5(IV)$ and $\alpha 6(IV)$ collagen chains in the developing human intestine. *Dev. Dyn.* 212 :437-447.

Skalli O., Gabianni G. (1988). The biology of the myofibroblast relationship to wound contraction and fibrocontractive diseases. In *The Molecular and cellular Biology of wound repair*, edited by Clark RAF, Henson PM, pp:373-402.

Skalli O., Schürch W., Seeceemayer T., Lagacé R., Montandon D., Pittet B., Gabbiani G. (1989). Myofibroblasts from diverse pathologic settings are heterogeneous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. *Lab. Invest.* 60(2) :275-285.

Stallmach A., Schupman D., Riese H.H., Matthes H., Rieken E.O. (1992). Increased collagen type III synthesis by fibroblasts isolated from strictures of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 102 :1920-1929.

Stenson W F. (1995). Inflammatory bowel disease. *Text book of Gastroenterology*, 2^{ed}, Edited by Yamada T. Philadelphia, J B Lippincott, pp:1748-1806.

Tiger C.E., Champlaud M.F., Pedrosa-Domello F., Thornell E., Ekblom P., Gullberg D. (1997). Presence of laminin $\alpha 5$ chain and lack of laminin $\alpha 1$ chain during human muscle development and in muscular dystrophies. *J. Biol. Chem.* 272 :28590-28595.

Timpl R. (1989). Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Europ. J. Biochem.* 180:487-502.

Timpl R. (1996). Macromolecular organisation of basement membrane. *Cur. Opin. Cell. Biol.* 8:618-624.

Vachon P.H., Beaulieu J.-F. (1995b). Extracellular heterotrimeric laminin promotes differentiation in human enterocytes. *Am. J. Physiol.* 268 :G857-G867.

Vachon P.H., Durand J., Beaulieu J.-F. (1993). Basement membrane formation and re-distribution of $\beta 1$ integrins in human intestinal co-culture system. *Anat. Rec.* 236:567-576.

Vachon P.H., Loechel F., Xu H., Wewer U M., Engvall E. (1996). Merosin and Laminin in Myogenesis ; Specific Requirement for Merosin in myotube Stability and Survival. *J. Cell Biol.* 134 (6) :1483-1497.

Valentich J D., Popov V., Saada J L., Powell D W. (1997). Phenotypic characterization of an intestinal subepithelial myofibroblast cell line. *Am. J. Physiol.* 272(41):C1513-C1524.

Vogel K G., Paulsson M., Heinegard D. (1984). Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by small proteoglycan of tendon. *Biochem. J.* 223:587-597.

Wallace J L., Beck P L. (1996). Inflammatory mediators in inflammatory bowel disease. *Cur. Opin. Gastroenterol.* 12:334-339.

Winnemoller M., Schmidt M., Kresse H. (1991). Influence of decorin on fibroblast adhesion to fibronectin. *Europ. J. Cell. Biol.* 54:10-17.

Yao T., Talbot I C. (1996). The demonstration of pericryptal fibroblasts in background mucosa and dysplasia complicating ulcerative colitis. *Histopathology.* 28:325-331.

Yokosaki Y., Palmer E.L., Prieto A.L., Crossin K.L., Bourdon M.A. (1994). The integrin $\alpha 9 \beta 1$ mediates cell attachment to a non-RGD site in the third fibronectin type III repeat of tenascin. *J. Biol. Chem.* 263(43) :26691-26696.

Yurchenco P D., O'Rear J J. (1994). Basal lamina assembly. *Cur. Opin. Cell. Biol.* 6:674-681.